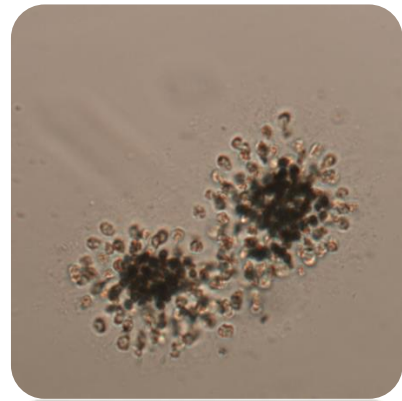


Ocorrência de cianobactérias e cianotoxinas na água de cinco importantes rios no Estado de Minas Gerais – Brasil



Miriam Aparecida da Silva Miranda

Mestrado em Biologia e Gestão da Qualidade da Água

Departamento de Biologia

Orientador

Professor Doutor Vitor Manuel O. Vasconcelos

Professor Catedrático

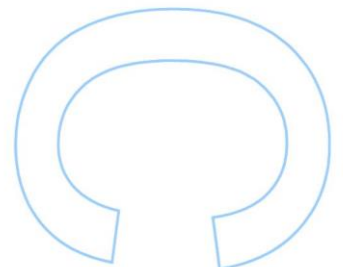
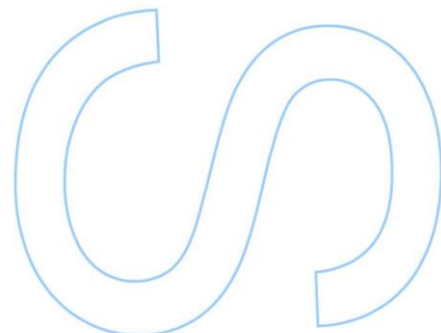
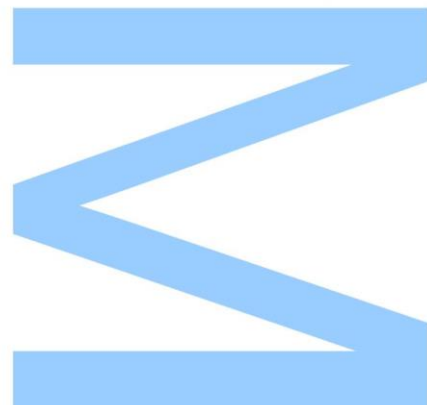
Faculdade de Ciência da Universidade do Porto

Coorientador

Professor Doutor Fernando Antônio Jardim

Biólogo

COPASA – Companhia de Saneamento de Minas Gerais



Ocorrência de cianobactérias e cianotoxinas na água de cinco importantes rios no Estado de Minas Gerais – Brasil

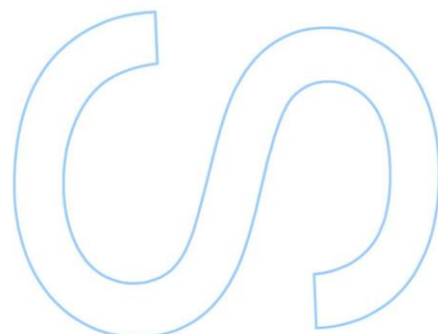
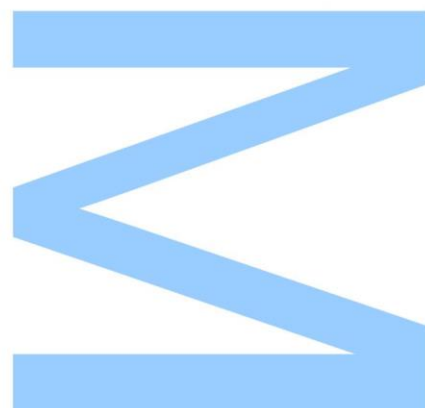
Miriam Aparecida da Silva Miranda

Tese submetida à Faculdade de
Ciências da Universidade do Porto
para obtenção do grau de Mestre em
Biologia e Gestão da Qualidade da
Água.

Departamento de Biologia

Faculdade de Ciências da
Universidade do Porto

PORTO, 2014



Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus por sempre iluminar meu caminho. E as pessoas que ele colocou neste meu caminhar a fim de me ajudar a concluir este projeto.

Agradeço *in memoriam* meu pai Luiz Alves Miranda Filho que em toda sua existênciase esforçou para me ajudar, acreditando sempre nos meus sonhos. E que teve de partir no momento em que eu iniciei o mestrado, e eu nem o adeus consegui dar. Ficará sempre no meu coração. Nunca questionou de forma negativa qualquer decisão minha em relação a minha formação profissional.

Agradeço a minha mãe Alaide da Silva Miranda pela guerreira que demonstrou ser. Foi no momento mais difícil, quando eu estava quase a desistir que ela insistiu e me mostrou que apesar da nossa perda a vida continuava e que havia outras pessoas que precisavam de mim. Nesse período de estudo cuidou com muita responsabilidade dos meus filhos para que eu conseguisse concluir meu trabalho.

A minhafilha Ana Clara e o meu filho Luiz, obrigada por pacientemente entenderem minha ausência e acreditarem que dias melhores virão. E estaremos sempre juntos peloamor e pela compreensão.

Agradeço também aos meus irmãos Cássio e Avilmar, e minha irmã Aline pela compreensão e dedicação. Aos meus sobrinhos e cunhados pelo carinho dedicado não só a mim, mas também aos meus filhos.

Muito obrigada aos colegasOlinda Silva, Rita Macieira, Fernanda Bastian, Ana Basto, Marta Figueiredo, Ana Ribeiro pela amizade, carinho e ajuda.

Aos professores da FCUPem especial ao Professor Doutor António P. Carvalho, a Professora Doutora Olga Lage, Professora Doutora Aurélia Saraiva e o Professor Doutor José Américo Souzaque nessa caminhada passaram ao meu lado compartilhando conhecimentos.

Agradeço profundamente a equipe Legeem especial, DoutoraCristiana Moreira, Doutora Joana Passo, DoutoraMicaela Vale e DoutoraJoão Morais que me orientaram nesse estudo e que agora apresento-o com muito orgulho.

A CIA SAAE de Pirapora-MG que me ajudou nas coletas de amostras em especial a Ana Maria Carvalho que se mostrou muito interessada pela pesquisa.

Agradeço a equipe COPASA de Belo Horizonte e Várzea da Palma pela imensa ajuda que me proporcionou com as amostras, análises microscópicas e no teste bioquímico. Pelo interesse que tiveram no projeto, proporcionando dessa forma parte do seu financiamento.

Ao Professor Doutor Fernando Antônio Jardim que aceitou ser meu coorientador, e foi o intermediário para que eu conseguisse o financiamento da COPASA para dar continuidade ao projeto, meu muito obrigada pela orientação, aprendi muito e faço votos que mais trabalhos possamos desenvolvermos juntos.

Ao Professor Doutor Vitor M. O. Vasconcelos pela orientação dada ao longo do trabalho e conhecimento compartilhado durante as aulas. Obrigada por sua paciência e carinho.

A Professora Doutora Maria Natividade pelo apoio, orientação, pela amizade e carinho que a mim dedicou como uma mãe. Sentirei imensa saudade. Também sou muito grata pelo conhecimento compartilhado no desenvolvimento desse trabalho.

“Tudo posso naquele que me fortalece”

Filipenses 4:13

“Para tudo há um tempo, para cada coisa um momento abaixo do céu”

Eclesiástico 3:1

Resumo

Ocorrência de cianobactérias e cianotoxinas na água de cinco importantes rios no Estado de Minas Gerais – Brasil

Durante as últimas décadas tem-se registado um aumento da existência de florações de cianobactérias, em rios, lagos, lagoas e reservatórios. As cianobactérias são microrganismos procariotas, fotoautotróficos, oxigénicos e tem a parede celular semelhante às bactérias gram negativas. Com uma ampla distribuição geográfica, são encontradas numa diversidade de ambientes, desde ecossistemas terrestres, água doce, salobra ou marinhos e mesmo em habitats extremos, tais como fontes termais, desertos, regiões tropicais e polares. Fazem parte da comunidade de microrganismos de um corpo hídrico, isto é, em sistemas de água doce não poluídos, são componente do fitoplâncton, no entanto, devido a fenómenos de eutrofização, ocorre a proliferação destes microrganismos, gerando florações. A ocorrência de florações de cianobactérias tóxicas constituem um problema mundial que vem aumentando em intensidade e frequência. Estes microrganismos são capazes de secretarem toxinas nocivas, que diferem na sua natureza química, bem como na sua ação tóxica, causando efeitos hepatotóxicos, neurotóxicos e dermatotóxicos, representando assim um risco significativo para o ambiente e saúde pública. Perante o problema da contaminação da água dos rios de Minas Gerais – Brasil por cianobactérias, sendo este um dos fatores que influenciam nos padrões da qualidade da água potável, podendo gerar danos a saúde pública, o presente trabalho teve como objetivo analisar a toxicidade da ocorrência de cianobactérias nas águas de cinco importantes rios de Minas Gerais, uma vez que, alguns deles são utilizados para abastecimento público. Na metodologia realizou-se a identificação das espécies através de microscopia, com respetivo isolamento e cultura das mesmas com posterior análise pela técnica ELISA para a deteção de toxinas. Ensaio moleculares foram realizados para a deteção das espécies e suas respetivas toxinas e ensaio filogenético do sequenciamento do gene da anatoxina-a. Para as amostras ambientais foram realizadas a técnica HPLC/PDA para deteção para possível produção de toxina. Para avaliar a eficiência na remoção de microcistina da água para abastecimento público foram ainda realizadas análises de amostras das ETAs de Pirapora e Várzea da

Palma (MinasGerais). Como resultado foi possível identificar nas amostras, cianobactérias potencialmente tóxicas e não tóxicas, como; *Microcystis aeruginosa*, *Planktothrix agardhii*, *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Arthrospira sp.*, *Sphaerocavum sp.*, *Geitlerinema sp.*, *Aphanizomenon sp.* No rio das Velhas ao norte de Minas Gerais foi detetada pela primeira vez cilindrospermopsina. O ribeirão São Pedro, afluente da Bacia do rio Jequitinhonha teve resultado positivo na análise molecular para espécie de *Cylindrospermopsis raciborskii* e para toxina cilindrospermopsina, porém no ensaio ELISA não expressou a cilindrospermopsina, mas a saxitoxina foi detetada. Na avaliação das amostras das ETA's foi possível confirmar em ambas as cidades a eficiência na remoção de microcistina no tratamento convencional associado ao carvão ativado em pó (CAP). Conclui-se que o ensaio molecular é uma ferramenta muito importante no monitoramento das cianobactérias e cianotoxinas para amostras ambientais como forma de minimizar os riscos à saúde pública.

Palavras-chave: Cianobactérias, cianotoxinas, eutrofização, qualidade da água

Abstract

Occurrence of cyanobacteria and cyanotoxins in water of five important rivers in the State of Minas Gerais – Brazil

During the last decades has been registered an increasing of cyanobacterial blooms in rivers, lakes, ponds and reservoirs. Cyanobacteria are prokaryotic, photoautotrophic and oxygenic microorganisms with a cell wall similar to gram-negative bacteria. With a wide geographical distribution, they are found in a variety of environments, from terrestrial, freshwater, brackish or marine ecosystems or even in extreme habitats such as hot springs, deserts, tropical and polar regions. Part of microorganisms community in an water body, i. e, in unpolluted freshwater systems are a phytoplankton component, however, due eutrophication phenomena, the proliferation of these microorganisms occurs, thus generating blooms. The occurrence of toxic cyanobacteria blooms, are a worldwide problem, which have been increasing in intensity and frequency. These microorganisms are able to produce harmful toxins, which differ in their chemical nature as well as in its toxic effect, leading hepatotoxic, neurotoxic or dermatotoxic effects, presenting thus a significant hazard to the environment and public health. Faced with the problem of water contamination by cyanobacteria in rivers of Minas Gerais (Brazil), being this one of the factors that influence the standards of water quality, causing damage to public health, the present work aimed to analyze the toxicity of occurrence of cyanobacteria in waters of five important rivers of Minas Gerais, since some of them, are used for public supply. In methodology, species identification was performed by microscopy, with respective isolation and culturing of same with following analysis by ELISA technique to detect toxins. Molecular and phylogenetic assays were performed to detection of species and their respective toxin for sequencing of the gene *anatoxin-a*, respectively. For environmental samples, HPLC/PDA was used for detecting the production of toxins. In order to evaluate the removal efficiency of microcystin in water for public supply, were also carried out analysis of samples in Water Treatment Plant from Pirapora and Varzea de Palma (Minas Gerais). As a result it was possible identify in samples, potentially toxic and non toxic cyanobacteria, such as; *Microcystis aeruginosa*, *Planktothrix agardhii*, *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Arthrospira* sp., *Sphaerocavum* sp., *Geitlerinema* sp., *Aphanizomenon* sp. In Velhas

river, north of Minas Gerais was detected for the first time cylindrospermopsin. In São Pedro creek, affluent of basin Jequitinhonha river, had positive result in molecular assays to species of *Cylindrospermopsis raciborskii* and cylindrospermopsin toxin, however, by ELISA assay, cylindrospermopsin was not expressed but saxitoxin was detected. In sample evaluation of Water Treatment Stations, was possible confirmed, for both cities, removal efficiency of microcystin in conventional treatment associated with powdered activated carbon (PAC). It was concluded that the molecular test is a very important tool in monitoring of cyanobacteria and cyanotoxins for environmental samples in order to minimize the risks to public health

Keywords: Cyanobacteria, cyanotoxins, eutrophication, water quality

Índice

Agradecimentos.....	III
Eclesiástico 3:1.....	V
Resumo	VI
Abstract	VIII
Índice.....	X
Lista de figuras:	XIII
Lista de abreviaturas:.....	XV
1. Introdução.....	17
1.1 Apresentação	17
2 Eutrofização.....	19
3 Cianobactérias.....	21
3.1 Características das Cianobactérias.....	21
4 Cianotoxinas.....	23
4.1 Dermatotoxinas.....	25
4.2 Neurotoxinas.....	25
4.3 Hepatotoxinas.....	28
5 Cianotoxinas: Danos a saúde pública	32
6 Legislação Brasileira.....	33
7 Remoção de cianobactérias no tratamento de água	35
8 Características dos locais de amostragem.....	37
8.1 Bacia do rio das Velhas	37
8.2 Bacia do rio São Francisco	37
8.3 Represa de Furnas	38
8.4 Ribeirão São Pedro.....	38

8.5 Lagoa dos Namorados.....	39
8.6 Estação de tratamento de água residual de Matozinhos.....	39
8.7 Represa da Pampulha	40
9. Materiais e Métodos	41
9.1 Pontos de amostragem.....	41
9.2 Identificação dos géneros	43
9.3 Isolamento e cultivo dos géneros.....	44
9.4 Determinação de cianotoxina na água pela técnica de ELISA	45
9.5 Extração, deteção e quantificação de microcistina por HPLC-PDA.....	46
9.6 Extração, deteção e quantificação de cilindrospermopsina por HPLC-PDA ..	48
9.7 Extração do DNA	49
9.8 Amplificação do PCR	50
9.9 Sequenciamento.....	51
9.10 Análise filogenética	51
10. Resultado e discussão	54
10.1 Identificação dos géneros	54
10.2 Isolamento e cultura dos géneros	55
10.3 Determinação de cianotoxina na água pela técnica ELISA	58
10.4 Extração, deteção e quantificação de microcistina por HPLC/PDA	62
10.5 Extração, deteção e quantificação de cilindrospermopsina por HPLC/PDA .	63
10.6 Análise molecular – extração de DNA, amplificação do PCR, sequenciamento e filogenia	64
11 Conclusão	71
12. Referências Bibliográficas	71

Lista de tabelas:

Tabela 1. Principais características morfológicas e sua ocorrência no ambiente, segundo as diferentes ordens da classificação botânica de cianobactérias e a sua correspondência para subsecções da classificação bacteriana (Brito, et al., 2012; Waterbury, J. B., 2006; Lopes et al., 2012).	22
Tabela 2 Toxinas de cianobactérias e seus principais produtores, mecanismos de ação e principais mecanismos de detoxificação envolvidos na biotransformação destes compostos (Ferrão-Filho, 2009)	31
Tabela 3 Limites máximos admissíveis para cianotoxinas, conforme a Portaria 2914/11	34
Tabela 4 Valor máximo permitido conforme resolução 357/2005 para três diferentes classes de água doce	35
Tabela 5 - Identificação dos pontos da amostragem	42
Tabela 6 - Método de extração da fase sólida	47
Tabela 7 - Programa do gradiente de eluição	48
Tabela 8 Caracterização dos genes alvos utilizados no PCR ao longo do presente estudo	52
Tabela 9 Estirpes identificadas e submetidas a cultura	56
Tabela 10. Resultado do teste Elisa das ETA's – Análise da eficiência da remoção de microcistina	60
Tabela 11 Resultado do teste ELISA para saxitoxina	61
Tabela 12. Resultado PCR para conjunto génico mcy (toxina microcistina)	66
Tabela 13. Resultado PCR's (sxtI, anaC, Cyn/cyrB e Cyn/cyrC) para as amostras do presente estudo	67

Lista de figuras:

Fig. 1 Classificação das cianotoxinas conforme ação farmacológica e estrutura química	24
Fig. 2 Estrutura química da saxitoxina de cianobactérias, de acordo com Carneiro & Leite, 2008.....	26
Fig. 3 Estrutura química de neurotoxina (anatoxina – a, homoanatoxina-a e anatoxina-a(s)) de cianobactérias	27
Fig. 4 Estrutura química de Microcistina de acordo com Carneiro & Leite (2008)	29
Fig. 5 Estrutura química da Nodularina de acordo com Carneiro & Leite, 2008	29
Fig. 6 Estrutura química da Cilindrospermopsina conforme Carneiro & Leite, 2008....	30
Fig. 7 - Representação dos pontos da amostragem Fonte: IGAM, 2013	41
Fig. 8 Técnica de isolamento	45
Fig. 9 Purificação de DNA por adsorção em coluna	50
Fig. 10 Distribuição das cianobactérias isoladas no presente estudo.....	56
Fig. 11. Microfotografias optica da morfologia dos gêneros de cianobactérias, representando a diversidade nos rios de Minas Gerais. A. <i>Microcystis aeruginosa</i> (200x) rio das Velhas (bainha de mucilagem marcada pelo uso do nanquim); B. <i>Microcystis aeruginosa</i> (200x) Represa Pampulha (bainha de mucilagem marcada pelo uso do nanquim); C. <i>Cylindrospermopsis</i> sp. (400x) Bacia do Mucuri (presença de heterocito); D. <i>Planktothrix agardhii</i> (200x) Represa Pampulha; E. <i>Geitlerinema</i> sp. (200x); F. <i>Arthrospira</i> sp. (200x) Represa Pampulha (foto com epifluorescência); G. <i>Aphanizomenon</i> sp. (400x) Represa de Furnas (presença de heterocito intercalar); H. <i>Sphaerocavum</i> sp. (200x) rio das Velhas; I. <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> (400x) Represa Pampulha (presença de heterocitos terminais); J. <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> (200x) rio São Francisco (a. Presença do heterocito; b. Formação do heterocito).....	57
Fig. 12. Registro do pico referente a amostra de água bruta do rio das Velhas (Barra do Guaicuí)	62
Fig. 13. Índice de similaridade referente a amostra do rio das Velhas	62
Fig. 14. Espectro padrão característico da molécula microcistina-LR – 238nm.....	62
Fig. 15. Espectro característico da molécula de cilindrospermopsina.	63
Fig. 16. Espectro de absorbância de 262 nm padrão da cilindrospermopsina.....	63
Fig. 17. Índice de similaridade referente a amostra do rio das Velhas	64

Fig. 18. Resultado PCR para <i>Microcystis aeruginosa</i>	65
Fig. 19. Resultado do PCR para gene ps - Cilindrospermopsina	68
Fig. 20. Resultado do PCR para anatoxina-a.....	69
Fig. 21 Análise filogenética da sequência do gene anatoxina-a	70

Lista de abreviaturas:

Anac – Anatoxina

ASM- Meio de cultura ASM

ETA – Estação de tratamento de água

ETAR- Estação de tratamento de água residual

ETE – Estação de tratamento de esgoto

CAP – Carvão ativado em pó

CIIMAR – Centro interdisciplinar de investigação marinha

Cyn – Cilindrospermopsina

Cyr – Sintetase da cilindrospermopsina

CONAMA – Conselho nacional do meio ambiente

COPASA – Companhia de saneamento de Minas Gerais

Da - Dalton

DVQA– Divisão do controle da qualidade da água e esgoto

EDTA– Ácido etilenodiamina tetra acético

ELISA- *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

ETA – Estação de tratamento de água

ETAR- Estação de tratamento de água residual

HPLC - *High-performance liquid chromatography*

ip- Intraperitoneal

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IGAM- Instituto mineiro de gestão das águas

IQA – Índice da qualidade da água

LEGE- Laboratório de ecotoxicologia genómica e evolução

L- Litro

LD – Limite de deteção

LMA – Limite máximo admissível

LPS – Lipopolissacarídeo

Mc- Toxina microcistina

mcy – Sintetase da microcistina

p.c – Peso corpóreo

PDA - *Photodiode Array Detector*

PST- Toxina paralisante de saxitoxina

Stx – Toxina saxitoxina

1. Introdução

1.1 Apresentação

Perante o problema da falta de água no mundo, tanto em qualidade como em quantidade, o Brasil é um país privilegiado, pois possui cerca de 16% de toda água potável do planeta. Contudo, apesar da abundância de água, o país enfrenta problemas quanto à sua má distribuição e eutrofização nos corpos d'água. O rápido crescimento populacional a formação de aglomerados urbanos e o aumento da produção agrícola e industrial resultaram no aumento do despejo de poluentes nos corpos d'água, principalmente matéria orgânica e nutrientes como nitrogénio e fósforo tornando-os cada vez mais eutrofizados. Este fenómeno propicia a proliferação excessiva de algas e cianobactérias potencialmente tóxicas em reservatórios e corpos hídricos usados para abastecimento público. Esses eventos têm sido cada vez mais frequentes, causando impactos sociais, económicos e ambientais (Tundisi, 2008). A ocorrência de florações de cianobactérias é um problema mundial, a implantação de monitoramento em abastecimento de água tem sido realizado, contudo, no Brasil há muitas cidades onde não há tratamento de água residual, dessa forma os rios recebem imensas cargas de resíduos diariamente, promovendo a proliferação das cianobactérias e suas toxinas (IBGE 2011). É uma das consequências mais graves do processo de eutrofização em corpos d' água, pois ocasiona o aumento da ocorrência de florações tóxicas de cianobactérias e a presença de suas toxinas nos diferentes níveis da cadeia trófica. Essas florações vêm aumentando em intensidade e frequência, sendo possível visualizar um cenário de dominância desses organismos em muitos reservatórios brasileiros. Ocasionalmente um grande problema para as empresas destinadas ao tratamento de água. A grande concentração das cianobactérias faz com que a pequena quantidade de toxinas presentes em cada célula se potencialize e provoque consequências nocivas aos organismos que as consomem, inclusive a população humana.

A biologia molecular é uma importante ferramenta na identificação de cianobactérias e na avaliação do seu potencial tóxico pela identificação de genes específicos para cada espécie e de genes envolvidos na produção de toxinas, podendo detetar precocemente as florações tóxicas, o que pode facilitar o monitoramento de ambientes aquáticos (Ferrão-Filho, 2009), diminuindo assim os riscos para saúde pública e dessa

forma, tornando breve o tempo para a obtenção de resultados analíticos, melhorando a produtividade no laboratório, facilitando o trabalho e reduzindo custos. Mais ainda, apresenta uma elevada sensibilidade e especificidade. E como forma de confirmação da produção das toxinas há disponíveis os métodos analíticos; físico-químico, como HPLC-PDA (*High-performance liquid chromatography*) e bioquímico, como o teste enzimático ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) (Carneiro & Leite, 2008).

O Estado de Minas Gerais está localizado na Região Sudeste do Brasil entre os paralelos de 14°13'58" ' e 22°54'00" ' de latitude sul e os meridianos de 39°51'32" ' e 51°02'35" ' a oeste de Greenwich, situada num planalto com altitude que varia de 100 a 1500 metros e possui, segundo o IBGE (2010), uma população de 19.597.330 habitantes, distribuídos em 853 municípios em uma área de 586.522,122 km², sendo o quarto Estado maior em extensão territorial. É um estado muito rico em nascentes de água. A rede hidrográfica de Minas Gerais é composta por 17 bacias e possui cerca de 10.000 cursos de água. As grandes bacias hidrográficas do país têm suas origens no território mineiro. São essas inúmeras nascentes que conferem ao Estado o título de Caixa D'Água do Brasil. Esses recursos hídricos são amplamente utilizados pelas usinas hidrelétricas e represas, nos açudes e canais para irrigação, nas atividades de Turismo e lazer. No entanto, grande parte dos rios de Minas se encontra ameaçados pela exploração desenfreada feita pelo homem, de maneira predatória e irresponsável, tanto em decorrência do desmatamento das áreas das nascentes e das matas de galeria, quanto do lançamento de lixo e esgoto, sobretudo aqueles produzidos nos centros urbanos e pelas grandes unidades industriais. O baixo nível de consciência da sociedade em relação à preservação ambiental também contribui para a degradação desses mananciais.

Peranteo problema da contaminação da água dos rios de Minas Gerais por cianobactérias, sendo este um dos fatores que influenciam nos padrões da qualidade da água potável, podendo gerar danos a saúde pública, portanto é necessário analisar a toxicidade da ocorrência de cianobactérias nas águas de cinco importantes rios de Minas Gerais, uma vez que, alguns destes são utilizados para abastecimento público. E ainda identificar géneros e espécies de cianobactérias das amostras em estudo, averiguar e quantificar as possíveis toxinas produzidas. E avaliar a eficiência do sistema da Estação de tratamento de água de Pirapora-MG e Várzea Palma-MG na remoção de microcistina.

2 Eutrofização

A eutrofização é uma resposta biológica ao aumento da concentração de nutrientes, especialmente fósforo e nitrogénio num ecossistema aquático (Esteves, 1998). Pode ocorrer de forma natural ou artificial (Azevedo, 1998; Jardim, 2011).

Quando natural, é um processo lento e contínuo que resulta do transporte de nutrientes transportados pelas chuvas e pelas águas superficiais que lavam a superfície terrestre. Corresponde a um envelhecimento natural de um corpo d' água (Macedo & Sipaúba – Tavares, 2010).

A eutrofização artificial é induzida pelo homem, também conhecida como antropogênica. Neste caso, os nutrientes podem ter diferentes origens, como: esgotos domésticos, efluentes industriais, atividades agrícolas e pecuária (Anciutti & Cochôa, 2010). Este tipo de eutrofização é responsável pelo envelhecimento precoce de um ecossistema aquático. A eutrofização artificial é um processo dinâmico, o qual resulta em profundas modificações qualitativas e quantitativas nas comunidades aquáticas, nas condições físicas e químicas do meio e no nível de produção do sistema, podendo ser considerada uma fonte de poluição. Está relacionada com o aumento da população humana, da industrialização, do uso de fertilizantes químicos na agricultura e produtos de limpeza contendo compostos polifosfatados. Todos esses fatores resultam na liberação de nutrientes, como fosfato e nitrogénio, que são compostos estimuladores da eutrofização (Macedo & Sipaúba-Tavares, 2010).

Os casos de eutrofização artificial no Brasil são, na quase sua totalidade, promovidos pelo lançamento de água residuais domésticos e industriais não tratados (in natura), (Barreto et al., 2013; Macedo & Sipaúba-Tavares, 2010). Os ecossistemas aquáticos próximos aos centros urbanos estão se transformando em verdadeiros depósitos de esgotos, gerando enormes prejuízos económicos e sociais para a população brasileira (Tundisi, 2008).

Pesquisa do governo federal indica que cerca de 60% da população brasileira ainda não dispõe de tratamento de esgotos. Destaca-se que apenas 35% do esgoto coletado é tratado, o restante 65% tem seu destino final, os ecossistemas aquáticos do país. E quando há tratamento da água residual na quase totalidade dos casos, não ocorre a

fase terciária que confere a eliminação de fósforo e nitrogénio, sendo estes os principais agentes da eutrofização artificial. Sendo assim, a grande maioria das ETAR_s brasileiras funcionam precariamente e com isto, são de baixa ou baixíssima eficácia ao tratamento das águas residuais (Esteves, 1998; IBGE, 2011).

São vários os motivos que desencadeiam a eutrofização, e dentre eles, o represamento de um rio (Vasconcelos, 2006) e o consequente aumento do nível da água representa uma grande fonte de nutriente para o meio, proporcionando assim, uma alteração do estado trófico do reservatório. E dependendo da localização ocupada pelos terrenos agrícolas, pelas florestas, pelas zonas de urbanização ou industriais, a amplitude da eutrofização é variável. Num ecossistema lântico a profundidade interfere no crescimento de fitoplâncton, sendo que os lagos pequenos e pouco profundos são geralmente lugares mais propícios ao desenvolvimento de fitoplâncton. Para Freire & Bollman (2003), a inter-relação dos inúmeros fatores climatológicos, hidrológicos, morfológicos, físico-químicos e biológicos que ocorrem tanto na bacia quanto no próprio corpo hídrico são motivos que levam ao aumento da densidade de populações de cianobactérias. Segundo Chorus & Bartram, (1999) a temperatura da água, ambientes com disponibilidade de nutrientes, concentrações de N:P e concentrações de CO₂, pouca intensidade de luz, pH elevado, alta capacidade de armazenagem de fósforo, são fatores favoráveis aos resultados mais visíveis da eutrofização. Pouca precipitação anual, associada a altas taxas de evaporação, também contribuem para concentrar sais minerais e nutrientes inorgânicos na água.

Em condições normais, ofitoplâncton e os organismos zooplanctónicos convivem de modo equilibrado em lagos, reservatórios e rios, não havendo dominância excessiva de uma determinada espécie em detrimento da outra. Mas quando há algum tipo de interferência que enriquece a água com nitrogénio e fósforo, algumas espécies passam a ser dominantes, multiplicando-se de forma excessiva e dando origem ao fenómeno chamada floração, principalmente por cianobactérias (Deberdt, 2004).

Em função do nível de eutrofização a qualidade da água pode ser afetada de tal modo a torná-la imprópria para abastecimento público, recreação ou outros usos. Pode também como consequência, a redução de oxigénio dissolvido, perda das qualidades cénicas, aumento do custo de tratamento, morte extensiva de organismos aquáticos (Azevedo, 1998).

3 Cianobactérias

3.1 Características das Cianobactérias

As cianobactérias são organismos procariotas, pois em sua célula há ausência da membrana nuclear. De acordo com sua morfologia podem ser filamentosas ou cocóides, encontradas na forma unicelular ou formando colônias (Campinas et al., 2002; Carvalho, et al., 2013). Sua parede celular é semelhante a das bactérias gram negativas (Beltrame & Pascholati, 2011; Fathalli et al., 2011), uma vez que parte da célula é composta pelo componente lipopolissacarídeo –LPS (Carneiro & Leite, 2008). Porém as cianobactérias não são vistas como organismos patogênicos, pois não existem registros de que possam multiplicar nos organismos hospedeiros (Adams, 2000). Por outro lado são organismos fotoautotróficos, oxigênicos (Anciutti & Cochôa, 2010; Beltrame & Pascholati, 2011; Brito et al., 2012) e contém em suas células diferentes pigmentos fotossintéticos como a clorofila a, que corresponde a coloração esverdeada, ficocianina que lhe confere a cor azul e algumas espécies possuem também um pigmento vermelho, a ficoeritrina (Sant’Anna, 2006). Em algumas espécies há formação de aerótopos (vesículas gasosa) e a bainha de mucilagem, essas estruturas proporcionam as cianobactérias vantagens sobre outros grupos, pois permite flutuação e proteção para locais favoráveis para seu crescimento. Outras espécies de cianobactérias podem ser fixadoras de nitrogênio (Beltrame & Pascholati, 2011), por meio de uma célula vegetativa conhecida como heterocito no qual é expressada quando o meio está desfavorável, ou seja, quando há deficiência de nitrogênio no corpo hídrico. Esta célula vegetativa também pode originar o acineto, esta célula possui parede espessa e guarda em seu interior grânulo com substâncias de reserva produzida pela própria cianobactérias (Silva et al., 2013). As cianobactérias são cosmopolitas e apresentam grande tolerância as condições ambientais e climáticas podendo ser encontradas em uma variedade de ambientes, desde dulcícolas, marinhos, salobros e terrestre (Canto de Sá et al., 2010). Estudos relatam fósseis datados de 3,5 milhões de anos e pensa-se que terão sido os organismos responsáveis pela oxigenação da atmosfera terrestre (Fathalliet al., 2011; Leão et al., 2012). Entretanto, estudos com base em biomarcadores de DNA, sugerem que estes microrganismos apenas surgiram há cerca de 2,6 milhões de anos. Com base na

abordagem filogenética as cianobactérias estão classificadas em cinco subseções, fundamentadas em uma taxonomia bacteriológica, que coincide com a ordem da abordagem botânica (Tabela 1).

Tabela 1. Principais características morfológicas e sua ocorrência no ambiente, segundo as diferentes ordens da classificação botânica de cianobactérias e a sua correspondência para subseções da classificação bacteriana (Brito, et al., 2012; Waterbury, J. B., 2006; Lopes et al., 2012).

Classificação botânica	Classificação bacteriana	Principais recursos morfológicos, ocorrência e espécies típicas
Ordem Chroococcales	Subseção I	Cianobactérias unicelulares que se reproduzem por divisão celular binária ou por rebentos numa única célula, em colônias mantidas juntas pela mucilagem ou então por revestimentos laminados. Muitas espécies são planctônicas e contêm vesículas de gás. Elas ocorrem em águas doces bem como em ambientes marinhos. Os gêneros típicos são <i>Synechocystis</i> e <i>Microcystis</i> .
Ordem Pleurocapsales	Subseção II	Algumas espécies podem sempre ou por vezes reproduzirem-se através de pequenas células esféricas que são produzidas por múltiplas divisões das células-mães. Geralmente crescem em ambientes aquáticos anexadas aos substratos. Um gênero típico é a <i>Pleurocapsa</i>
Ordem Oscillatoriales	Subseção III	Filamentosas, maioritariamente unisseriadas. Cianobactérias sem células especiais. Os tricomas normalmente têm uma bainha e muitas espécies têm vesículas de gás. O grupo é ecologicamente diversificado e ocorre em plâncton, bentônica e em habitats periféricos em águas doces e em ambientes marinhos. Os gêneros típicos são <i>Oscillatoria</i> , <i>Planktothrix</i> e <i>Spirulina</i>
Ordem Nostocales	Subseção IV	Filamentosas, maioritariamente unisseriadas. Cianobactérias que podem formar células especializadas (heterócitos e acinetos), sendo que algumas podem formar hormogonia (formação de tricomas dotados de mobilidade que dão origem a novos filamentos). Algumas espécies têm vesículas de gás. Elas ocorrem em plâncton, bentônica e habitats periféricos em águas doces ou ambientes marinhos e podem também ser encontradas em ambientes terrestres. Os gêneros típicos são <i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> e <i>Nodularia</i> .
Ordem Stigonematales	Subseção V	Filamentosas, normalmente são cianobactérias multisseriadas ramificadas (verdadeira ou falsa) que podem formar células especializadas (heterocitos e acinetos) e alguma forma de hormogonia. Ocorrem em ambientes aquáticos e terrestres mas normalmente não em plâncton. O gênero é <i>Fischerella</i> .

4 Cianotoxinas

Muitas espécies de cianobactérias tem a capacidade de secretar metabólitos secundários que podem causar alterações nas propriedades organolépticas da água, isto é, promovem gosto e odor desagradáveis à água, devido a geosmina e o 2-methylisoborneol (2-MIB) (Campinas et al., 2002; Carneiro&Leite,2008;Sant'Anna et al., 2006). São responsáveis pela produção e liberação de compostos potencialmente tóxicos (Tabela 2). Esses metabólitos são conhecidos por cianotoxinas (Figura 1) (Canto de Sá et al., 2010) são libertadas para o meio externo por rompimento da parede celular, o que acontece por senescência das células ou sob a ação de algicidas, como o sulfato de cobre. Contudo, a cilindrospermopsina pode ser excretada pelas células em condições fisiológicas normais, uma vez que sua estrutura lhe confere alta polaridade, portanto a toxina possui alta solubilidade em água, caracterizando-a como cianotoxina intra e extracelular (Masten & Carson, 2000; Stuken & Jakobsen, 2010). Cianotoxinas com essas características as tornam especialmente importantes, pois não há necessidade de ruptura das células para que a água seja contaminada. Essas substâncias são nocivas a animais terrestres, aquáticos e aos seres humanos, através da ingestão ou contato com a água contaminada (Carneiro& Leite, 2008; Cianca et al.,2012). A principal forma de exposição humana para as cianotoxinas é através do consumo de água contaminada. Por outro lado, a exposição relacionada com os usos recreacionais, quer por consumo acidental, quer por contato da água contaminada com a pele e mucosas ou por inalação, também tem uma importância relativa. Adicionalmente, também pode ocorrer exposição através do consumo de produtos dietéticos que sejam produzidos à base de cianobactérias, transferência a partir da cadeia alimentar, uma vez que, alguns animais têm a capacidade de acumularem toxinas; como por exemplo os filtradores (moluscos e crustáceos) e até mesmo os peixes. E a forma mais perigosa de contaminação é através de exposições intravenosas, por exemplo, nas unidades de hemodiálise.(Aráoz et al., 2010;Ferrão-Filho, 2009; Pearson et al., 2010; Vasconcelos, 2006). Os fatores que favorecem a produção de toxinas são variáveis. Há evidências de que a produção e a acumulação estão relacionadas com o crescimento das células. De fato, nos períodos de crescimento exponencial, a produção de toxinas tende a aumentar enquanto, na fase estacionária de crescimento, a produção tende a diminuir. Outros fatores como a temperatura, pH, produção

primária de clorofila-a, radiação solar e a função de defesa contra herbívora ocasionam o aumento da produção da toxina (Anciutti & Cochôa, 2010). No entanto, convém relatar que nem todas as espécies de cianobactérias produzem toxinas, e na mesma espécie podem encontrar estirpes tóxicas e não-tóxicas vivendo no mesmo ambiente (Molica & Azevedo, 2009; Osswald et al., 2007; Regueiras, 2009).

Estão identificados cerca de 150 gêneros de cianobactérias englobando perto de 2000 espécies, dentre as quais pelo menos 40 espécies (Molica & Azevedo, 2009) são consideradas como produtoras de cianotoxinas. Os principais gêneros são *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya*, *Microcystis*, *Nostoc*, *Oscillatoria* e *Planktothrix* (Carmichael, 2001; Fastner et al., 1998). Conforme a estrutura química podem ser classificadas como peptídeo cíclico, alcalóide e lipopolissacarídeo (Carmichael et al., 2001; Carneiro & Leite, 2008; Jardim, 2008). As cianotoxinas de acordo com os efeitos gerados nos animais são classificadas como: hepatotóxica, neurotóxica, e dermatotóxica (Lopes et al., 2012; Pinho et al., 2012).

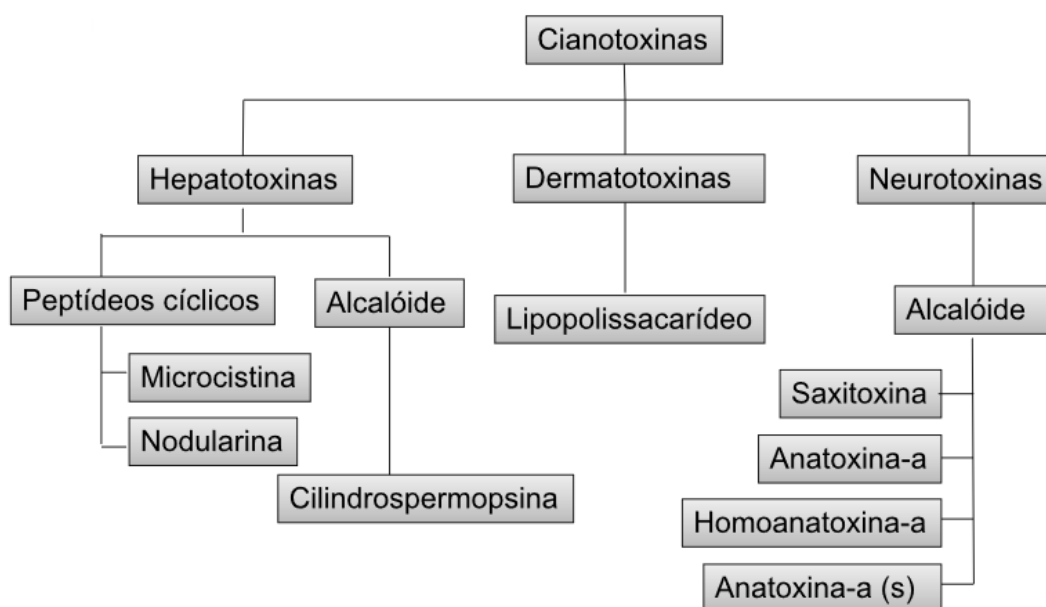


Fig. 1 Classificação das cianotoxinas conforme ação farmacológica e estrutura química

4.1 Dermatotoxinas

As dermatotoxinas consistem em lipopolissacarídeos, existentes na membrana externa da parede celular das cianobactérias. A sua toxicidade é evidenciada pelo simples contato com a pele ou mucosas corporais, desenvolvendo-se uma reação alérgica (Silva et al., 2013). De um modo geral, as dermatotoxinas apresentam uma produção ubíqua dentro das cianobactérias, contudo, o seu grau de toxicidade não é tão elevado como o de outros lipopolissacarídeos, desaparecendo os sintomas se o contato for interrompido (Caneiro & Leite, 2008).

4.2 Neurotoxinas

As neurotoxinas são compostos alcalóides do tipo carbamato, de rápida ação, e têm como alvo o sistema neuromuscular. Provocam morte de animais no intervalo de poucos minutos e ou a poucas horas, devido à parada respiratória. Produzidos por espécies de *Aphanizomenon*, *Oscillatoria*, *Anabaena*, *Lyngya*, *Cylindrospermopsis* e *Trichodesmium* (Sant'Anna, 2006). Três tipos foram descritos até o momento: saxitoxina, anatoxina-a e a anatoxina-a(s) (Silva et al., 2013).

4.2.1 Saxitoxina

A saxitoxina atua ao nível dos canais de sódio dos axônios, bloqueando-os e impedindo a propagação do impulso nervoso (Aráoz et al., 2010; Pearson et al., 2010). Em relação a toxicidade aguda, resulta na paralisia dos músculos respiratórios, seguida de morte por paragem respiratória (Kellmann et al., 2008). Também conhecido como PSP's (*Paralytic Shellfish Poisons*). Essas substâncias, das quais existem mais de 18 variantes, podem ser divididas em três grupos, de acordo com sua estrutura: as saxitoxinas (SXT), de estrutura não sulfatada, as goniatoxinas (GTXS) monossulfatadas e as C- toxinas dissulfatadas, demonstrada na (Figura 2). Em geral

os sintomas por intoxicação aguda são paralisia, hipotensão, dispnéia e falência respiratória. A DL_{50} da saxitoxina, por via intraperitoneal, em camundongos machos é de cerca de $10\mu\text{g.kg}^{-1}\text{pc}$ (peso corpóreo). E em fêmeas é de $8,0\mu\text{g.kg}^{-1}$ de peso corpóreo (Jardim, 2010; Sant' Anna, 2006).

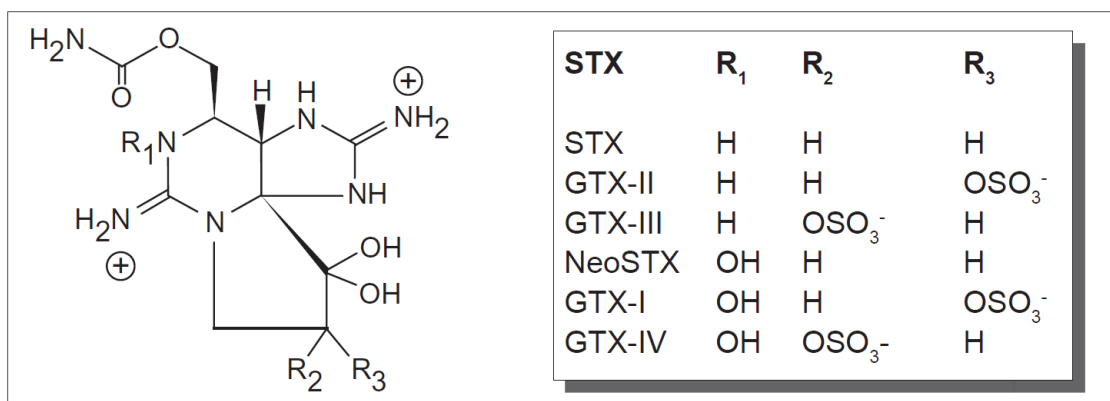


Fig. 2 Estrutura química da saxitoxina de cianobactérias, de acordo com Carneiro & Leite, 2008

4.2.2 Anatoxinas

Anatoxinas (Figura 3) atuam ao nível da fenda sináptica. São moléculas relativamente estáveis no escuro, mas quando pura em solução ocorre uma rápida degradação fotoquímica com a luz solar. Esta degradação é acelerada por condições alcalinas. A meia-vida para a degradação fotoquímica é de 1 a 2 horas. Sob condições naturais de iluminação, com pH 8-10 e concentrações iniciais baixas ($10\mu\text{g/L}$), o tempo necessário para degradar 50% do total de anatoxina-a (meia-vida) é de 14 dias (Chorus e Bartram, 1999).

4.2.2.1 Anatoxina-a

A Anatoxina-a (2-acetil-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-eno) é um alcalóide que possui uma amina secundária bicíclica, com massa molecular de 165 Da. A Anatoxina-a e seu homólogo, a Homoanatoxina-a, agem como potentes agonistas nicotínicos, que impedem reversivelmente a despolarização neuromuscular de recetores nicotínicos

colinérgicos em músculo esquelético estriado de mamíferos (Rodríguez et al., 2006). A ativação do receptor nicotínico pós-sináptico da acetilcolina resulta em um fluxo de sódio, produzindo despolarização local suficiente para abrir os canais desse cátion e, também, os canais de cálcio dependentes de voltagem. A célula posterior pode amplificar a resposta, ativando mais canais de cálcio. Há um bloqueio da transmissão elétrica decorrente desta despolarização, que em dose suficientemente alta, pode levar à paralisia, asfixia e morte (Molica & Azevedo, 2009; Rodríguez et al., 2006). Os sinais clínicos de intoxicação por essas substâncias são paralisia progressiva, forte respiração abdominal, cianose e convulsão. A DL_{50} por via intraperitonal (i.p.) da anatoxina-a é $375\mu\text{g.kg}^{-1}$ de peso corpóreo e para a homoanatoxina-a corresponde a $250\mu\text{g.kg}^{-1}$ de peso corpóreo (Carneiro e Leite, 2008; Sant'Anna, 2006).

4.2.2.2 Anatoxina-a(s)

Anatoxina-a(s) É um organofosforado natural (éster metílico da N-hidroxiguanidina fosfato), de massa molecular 252 Da. Este composto se assemelha a ação de um inseticida organofosforado sintético, inibidor irreversível da acetilcolinesterase. A inibição da acetilcolinesterase impede a hidrólise da acetilcolina e induz uma excessiva estimulação colinérgica, promovendo a abertura dos canais iônicos, até provocar a exaustão do músculo e conseqüentemente, ocorre a paralisção muscular. O sinal de salivação viscosa excessiva é um sintoma específico desta toxina; por esse motivo o sufixo (s) em sua nomenclatura (Rodríguez et al., 2006). A mortalidade é causada por parada respiratória e/ou cardíaca. A DL_{50} em camundongos por via intraperitonal é de $20\mu\text{g.kg}^{-1}$ de peso corpóreo (Carneiro e Leite, 2008; Sant'Anna et al, 2006).

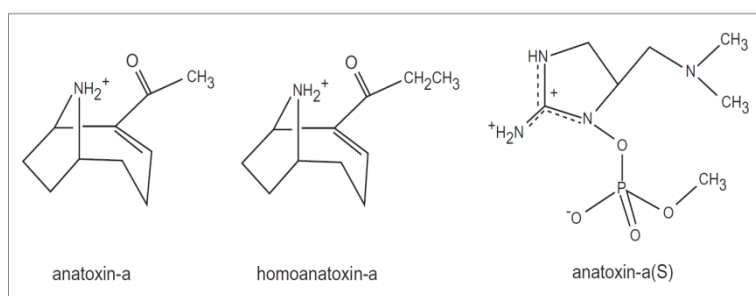


Fig. 3 Estrutura química de neurotoxina (anatoxina – a, homoanatoxina-a e anatoxina-a(s)) de cianobactérias

4.3 Hepatotoxinas

As hepatotoxinas incluem as microcistina, nodularina e cilindrospermopsina. As microcistinas e nodularinas são péptidos cíclicos, que atuam na inibição das fosfatases proteicas PP1 e PP2A (Fastner et al., 1998; Matthiensen et al., 1999; Tanabe et al., 2007;). A cilindrospermopsina é um alcalóide guanídínico cíclico que atua na inibição da síntese proteica. A produção da hepatoxina já foi detetada em *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Oscillatoria* e *Cylindrospermopsis*. Como o nome indica, as hepatotoxinas têm como órgão alvo o fígado. São responsáveis pela destruição da sua estrutura interna, levando a situações extremas; à hemorragia intra-hepática, choque hipovolêmico e morte (Azevedo et al., 2002; Matthiensen et al., 1999; Tanabe et al., 2007).

4.3.1 Microcistina

As microcistinas (Figura 4), hepatotoxinas mais comumente encontradas em florações de água doce, peptídeos cíclicos formados por sete aminoácidos heptapeptídeos cíclicos (Fastner et al., 1998; Matthiensen et al., 1999) de peso molecular entre 800 e 1100 Da. As intoxicações agudas podem causar a morte em algumas horas por hemorragia no fígado e as intoxicações crônicas podem levar ao desenvolvimento de tumores hepáticos (Sant'Anna, 2006). Essas toxinas são caracterizadas de acordo com o arranjo dos aminoácidos na molécula. Cerca de 60 variações estruturais de microcistina já foram identificadas. As mais conhecidas são MC-RR, MC-YR, MC-LR e MC-LA (Carneiro & Leite, 2008; Vasconcelos et al., 2011). Em ambientes aquáticos essa toxina permanece no interior das cianobactérias e só são liberadas em lise celular. Sua alta estabilidade química e hidrossolubilidade representam grande risco de contaminação do meio ambiente e possível contaminação de seres humanos (Fastner et al., 1998). A DL_{50} da microcistina-LR varia de 36 a 122 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de peso corpóreo; para as demais variantes de microcistinas, esses valores variam de 50 e 1200 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de peso corpóreo, tal variação está atribuída às diferenças das estruturas químicas das moléculas dessas cianotoxinas (Sant'Anna, 2006).

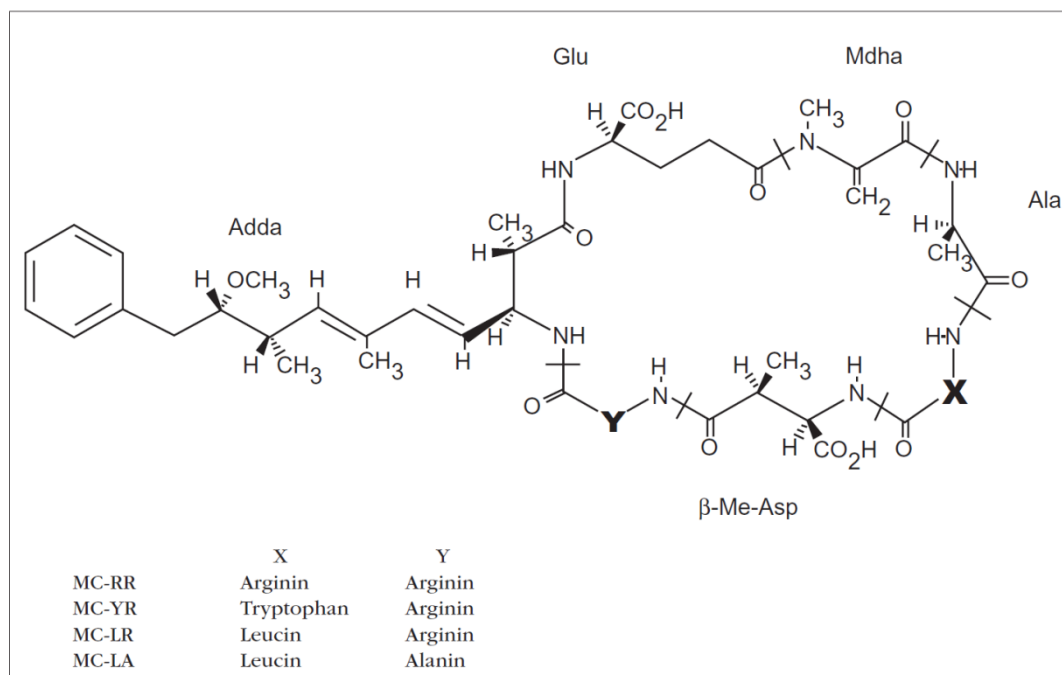


Fig. 4 Estrutura química de Microcistina de acordo com Carneiro & Leite(2008)

4.3.2 Nodularina

São peptídeos cíclicos hepatotóxicos formados por 5 aminoácidos (pentapeptídeos cíclicos). Assim como as microcistinas, as nodularinas (Figura 5) são solúveis em água e apresentam alta estabilidade química, oque traz importantes implicações sobre sua persistência no meio ambiente e exposição a humanos nos corpos hídricos, conforme experimentos realizados em animais sua toxicidade é dada por hemorragia e necrose de hepatócitos, alem de carcinogênese de fígado, (Carneiro& Leite, 2008).

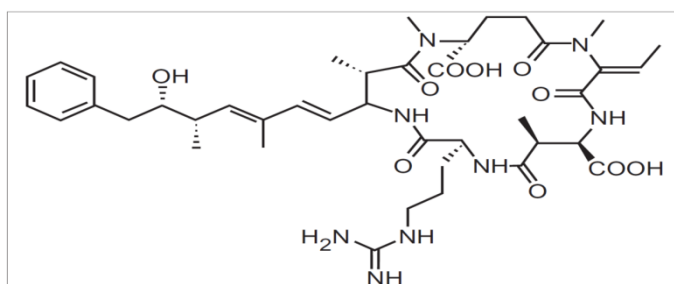


Fig. 5 Estrutura química da Nodularina de acordo com Carneiro & Leite, 2008

4.3.3 Cilindrospermopsina

É um alcalóide guanidínico cíclico hepatotóxico (Poniedzialek et al., 2014), de peso molecular 415 Da, altamente solúvel em água (Stuken & Jakobsen, 2010), isso devido sua alta polaridade caracterizando-a dessa forma como toxina intra e extracelular (Masten & Carson, 2000), (Figura 6). Isolados de *Cilindrospermopsis raciborskii*, *Umezakia natans*, *Aphanizomenon ovalisporum*. Essa toxina inibe a síntese protéica causando desestruturação e necrose no fígado, tendo sido observados também danos em células renais, cardíacas e pulmonares, e ainda em mucosa gástrica de camundongos. Também há evidências de que esta toxina tem efeitos genotóxicos, carcinogênicos e mutagênicos. Sua ação é lenta, para atingir efeito tóxico máximo é necessário 5 a 7 dias. Teste de toxicidade em camundongo, por via intraperitonal (ip), a DL_{50} para 24 horas, é de $2 \text{ mg.kg}^{-1} \text{pc}$ (peso corpóreo), passando a ser de $0,2 \text{ mg.kg}^{-1} \text{pc}$ (peso corpóreo), para 5 dias (Bittencourt-Oliveira et al., 2011; Sant'Anna, 2006).

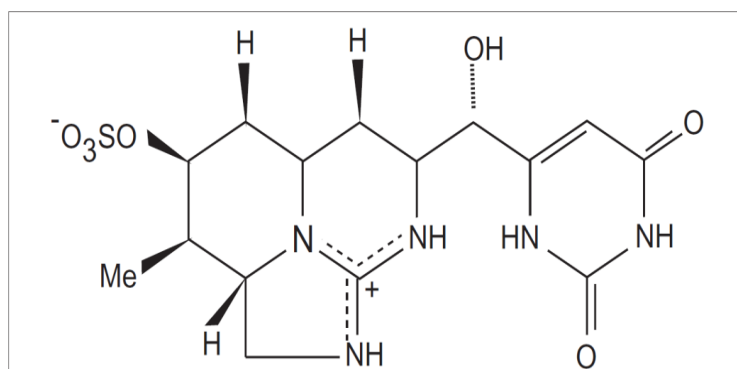


Fig. 6 Estrutura química da Cilindrospermopsina conforme Carneiro & Leite, 2008

Tabela 2 Toxinas de cianobactérias e seus principais produtores, mecanismos de ação e principais mecanismos de detoxificação envolvidos na biotransformação destes compostos (Ferrão-Filho, 2009)

Toxina	Produtor	Mecanismo de ação	Biotransformação
Microcistinas	<i>Microcystis</i> <i>Anabaena</i> <i>Plankthotrix</i>	Inibição de proteínas fosfatases (PP1 e PP2)	Glutathione-S-transferase
Nodularina	<i>Nodularia</i>	Inibição de proteínas fosfatases (PP1 e PP2)	Glutathione-S-transferase
Saxitoxinas	Dinoflagelados: <i>Protogonyaulax</i> <i>Alexandrium</i> <i>Gymnodinium</i> <i>Pyrodinium</i> Cianobactérias: <i>Anabaena</i> <i>Aphanizomenon</i> <i>Cylindrospermopsis</i> <i>Lyngbya</i>	Ligação e bloqueio dos canais de sódio em células nervosas	Glutathione-S-transferase
Anatoxinas	<i>Anabaena</i> <i>Aphanizomenon</i> <i>Cylindrospermum</i> <i>Plankthotrix</i> <i>Oscillatoria</i> <i>Microcystis</i>	Ligação irreversível ao receptor nicotínico S da acetilcolina	Citocromo P450 Glutathione-S-transferase
Anatoxina-a(s)	<i>Anabaena</i>	Inibição da atividade acetilcolinesterasica	Citocromo P450 Glutathione-S-transferase
Cylindrospermopsina	<i>Cylindrospermopsis</i> <i>Aphanizomenon</i> <i>Umezakia</i> <i>Raphidiopsis</i> <i>Anabaena</i>	Inibidor da síntese de proteínas Danos ao DNA	Citocromo P450
Lipopolissacarídeos	Cianobactérias em geral	Irritante ao contato, afetando qualquer tecido exposto	Deacilação via lipossomos

5 Cianotoxinas: Danos a saúde pública

Pelo fato das cianotoxinas serem hidrossolúveis e passarem pelo sistema de tratamento convencional de água, sendo inclusive resistentes à fervura, sua presença na água para consumo humano implica em sérios riscos à saúde pública. Portanto, sendo necessário o monitoramento das cianobactérias tóxicas e suas toxinas nos reservatórios de água para abastecimento público, com a finalidade de identificar os locais com sérios riscos potenciais. Também sendo prioridade estudos epidemiológicos de populações expostas a estas cianotoxinas nocivas a saúde humana, uma vez que, estudos tem mostrado resultados adversos, dentre estes o desenvolvimento de câncer.

Em 1878 na Austrália ocorreu o primeiro relato de intoxicação de animais, causada por floração de cianobactérias (Carvalho et al., 2013; Lopes et al., 2012). A partir de então, os registros de ocorrência de florações em reservatórios de abastecimento público, tem sido cada vez frequentes mundialmente. Países, como Austrália, Inglaterra, China e África do Sul descreveram ocorrências de intoxicações de populações humanas pela ingestão de água contaminada por cianobactérias. Em 1983, uma população rural localizada na Austrália foi abastecida com água de um reservatório com floração de *Microcystis aeruginosa*, onde este, teve seu tratamento com algicida (sulfato de cobre) o que ocasionou rompimento das células e liberação da toxina na água, promovendo sérios danos hepáticos na população. Em 1979 em Palm Island, Austrália, cerca de 140 crianças e 10 adultos foram hospitalizados após ingestão de água de um pequeno reservatório tratado com sulfato de cobre para corrigir problemas de odor e gosto na água. Em uma semana, muitas pessoas apresentaram um quadro de hepatointerite grave, levando ao tratamento de terapia intravenoso. Nas investigações resultaram no género *Cylindrospermopsis* e da toxina cilindrospermopsina (Carvalho, et al., 2013). Azevedo, 1998 relata forte evidência da correlação entre a ocorrência de florações de cianobactérias, no reservatório de Itaparica (Bahia) e a morte de 88 pessoas, entre as 200 intoxicadas, pelo consumo de água do reservatório, entre março e abril de 1988. No entanto, o primeiro e mais grave relato de intoxicação humano por cianotoxinas confirmado, ocorreu no Brasil em 1996, onde 116 de 131 pacientes renais crônicos, após terem sido submetidos a sessões de hemodiálise em uma clínica da

cidade de Caruaru(PE), sofreram um quadro de intoxicação, destes 76 vieram a óbito (Carmichael et al., 2001). Após as análises feita com amostras de sangue e fígado confirmaram a presença de microcistina e análise com os filtros de purificação da clínica foram identificadas para além da microcistina a toxina cilindrospermopsina (Azevedo et al., 2002). Essa contaminação ficou conhecida como a Síndrome de Caruaru. A ocorrência de *florações* de cianobactérias é um problema mundial, a implantação de monitoramento em abastecimento de água tem sido realizado, contudo, há casos onde o rio recebe imensas cargas de resíduos indústrias, domésticos e agrícolas diariamente, dessa forma promovendo a proliferação das cianobactérias e suas toxinas.

6 Legislação Brasileira

O Brasil foi o primeiro país do mundo a ter uma lei federal (Portaria n. 1469/2000 do Ministério da Saúde) sobre a obrigatoriedade de se fazer a detecção das cianobactérias e das cianotoxinas na água para abastecimento público (Jardim & Viana, 2003).

Em relação ao abastecimento público, a Portaria 2914/2011 do Ministério da Saúde (Tabela 3) estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. A primeira versão, no ano de 2000, foi o precursor ao inserir numa norma legal a obrigatoriedade do monitoramento das cianobactérias no manancial. A portaria em vigor exige que os responsáveis pelo controle da qualidade da água de sistemas de abastecimento supridos por mananciais superficiais monitorem as cianobactérias no ponto de captação de água mensalmente, quando o número de células de cianobactérias não exceder 10.000 células/mL como nível de vigilância e semanalmente, quando o número de células de cianobactérias exceder este valor. Também exige que sempre que o número de cianobactérias no ponto de captação exceder 20.000 células/mL seja realizada a análise semanal das cianotoxinas, pois neste caso as células de cianobactérias após a lise, já podem liberar uma concentração de cianotoxinas prejudicial a saúde humana. Dessa forma, é exigida a análise de microcistinas e saxitoxinas, devido ao seu efeito agudo e carcinogénico. As microcistinas ocorrem

com frequência e podem chegar a altas concentrações na água não tratada. As saxitoxinas são neurotóxicas e sua presença vem sendo detectada em diferentes mananciais brasileiros. Os limites máximos admissíveis (LMA) de cianotoxinas nas águas de abastecimento público foram propostos por vários pesquisadores, a fim de evitar os efeitos danosos à saúde pública. A Organização Mundial da Saúde -OMS adotou como valor máximo permitido 1,0 µg/L de microcistina em água potável, e este valor também foi incluído na Portaria MS 2914/2011, como valor máximo aceitável em água para abastecimento público no Brasil. Para saxitoxina estabelecido pela Portaria do Ministério da Saúde também segue o valor da OMS: 3,0 µg/L (Brasil, 2011). Em relação à cilindrospermopsina, a Portaria do Ministério da Saúde recomenda essa análise sempre que for detectada a presença de gêneros potencialmente produtores, observando o valor máximo aceitável de 1,0 µg/L. Também existe recomendação para a análise da presença de anatoxina-a (s) quando for detectada a presença de gêneros de cianobactérias potencialmente produtores no monitoramento de cianobactérias, porém sem estabelecimento de um (LMA). Quando os valores do (LMA) na água bruta forem atingidos ou ultrapassados, se torna necessário a tomada de várias medidas diferenciadas tanto no manejo como no tratamento de água, além do monitoramento e a prevenção de risco à saúde humana. Conforme a Portaria quando detectada a presença de cianotoxinas na água tratada, na saída do tratamento, será obrigatória a comunicação imediata às clínicas de hemodiálise e às indústrias de injetáveis (Brasil, 2011).

Tabela 3 Limites máximos admissíveis para cianotoxinas, conforme a Portaria 2914/11

Toxinas	Condições	Limites Máximos Admissíveis
Microcistina	Análise obrigatória em água para consumo humano	1µg/L
Saxitoxina		3µg/L
Cilindrospermopsina	Recomendação de análise em água para consumo humano quando forem observadas cianobactérias potencialmente produtoras	1µg/L
Anatoxina-a (s)		Não foi estabelecido valor

Fonte: Portaria 2914/11

A Resolução CONAMA nº 274, 29 de novembro 2000 (Brasil, 2000), referente às condições de balneabilidade, estabelece restrições à recreação de contato primário quando verificada a ocorrência de florações de algas e considera passível de interdição pelos órgãos de controle ambiental trechos dos corpos d'água em que ocorram toxicidade ou formação de spuma decorrente de florações de algas e cianobactérias.

A Resolução 357/2005 do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) dispõe sobre a classificação dos corpos de água, além de estabelecer condições e padrões de lançamentos de efluentes, incluindo limites de densidade de cianobactérias (Tabela4), (Brasil, 2005)

Tabela 4 Valor máximo permitido conforme resolução 357/2005 para três diferentes classes de água doce

Classes Uso destinado	Clorofila a ($\mu\text{g/L}^{-1}$)	Fósforo total (mg/L^{-1})	Cianobactéria (cels.ml/mm ³ .L ⁻¹)cc
1- Abastecimento para consumo humano simplificado, recreação de contato primário, irrigação de hortaliças e frutas que são consumidas cruas	10	0,020 (lêntico) 0,025 (intermediário) 0,1 (lótico)	20.000/2
2- Abastecimento para consumo humano convencional, recreação de contato primário, proteção comunidade aquáticas, recreação de contato primário, irrigação de hortaliças e aquicultura e a atividade de pesca.	30	0,030 (lêntico) 0,050 (intermediário) 0,1 (lótico)	50.000/5
3- Abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional ou avançado, irrigação de culturas, à pesca amadora, recreação de contato secundário e dessedentação de animais	60	0,05 (lêntico) 0,075 (intermediário) 0,15 (lótico)	100.000/10 50.000/5 (Para dessedentação de animais)

Fonte: Resolução Conama 357/2005

7 Remoção de cianobactérias no tratamento de água

Segundo Veiga, 2008 refere-se em sua pesquisa, que nos últimos anos tem sido muito frequente a florações de cianobactérias em reservatórios de abastecimento público. Gerando interferência na qualidade da água, uma vez que, promove efeitos negativos

de ordem organolética, pois altera a cor, odor e saborda água durante a produção de metabólitos secundários potencialmente tóxicos e de efeitos carcinogénicos(Canto de Sá et al., 2010). Estas cianotoxinas são na sua maioria endotoxinas, porém podem ser encontradas tanto dentro como fora da célula. Quando a célula da cianobactéria sofre lise, as toxinas são libertadas. A lise pode ocorrer naturalmente, ou seja, por senescência ou causada por produtos químicos como a utilização prévia de algicida durante as florações ou por ação mecânica (turbulência e bombeamento) que ocorrem nas etapas de tratamento da água (Cybis, 2006).

No tratamento da água em abastecimento público, a remoção das cianotoxinas não pode ser realizada a partir do processo de tratamento convencional, como: coagulação, floculação, sedimentação, filtração e cloração; é preciso utilizar outros meios para a eficiência da remoção destas toxinas. No entanto, método de tratamento convencional é eficiente para remoção das células intactas de cianobactérias (Muller, et al., 2009). Portanto, para a remoção das toxinas deve-se considerar a fração solúvel e a fração particulada. Sendo assim, os sistemas de tratamento de água que promove o rompimento das células durante o processo de tratamento, apresentam um potencial de risco a saúde pública, uma vez que pode haver libertação de cianotoxinas na água (Cybis, 2006). Para haver eficiência na remoção de toxina extracelular nos sistemas de tratamento de água há aplicação dos métodos de adsorção e/ou de oxidação. Para o método de adsorção é utilizado o carvão ativado em pó (CAP) ou granulado, de material de carbono com porosidade, capaz de coletar seletivamente gases, líquidos ou impurezas no interior dos seus poros, tem a função de clarificação, desodorização e purificação de líquidos ou gases. Este método é muito eficaz na remoção de cianotoxinas solúveis na água. Porém é necessário calcular bem a dose a ser utilizada, o tempo de contato, o tipo do carvão, ou seja, material de origem e tipo de ativação. A desvantagem do método é o fato do CAP sofrer uma única utilização durante o processo, gera resíduo sólido (lodo) e tornando-se assim, um procedimento dispendioso (Campinas et al., 2002). Segundo Muller e col., 2009 o carvão ativado em pó, cujo material de origem madeira mostrou-se uma capacidade máxima de adsorção de microcistina, após terem utilizado carvão ativado a base de casca de coco, de osso e antracito. Para o método de oxidação são empregados o cloro, o ozônio, permanganato de potássio, dentre outros. O cloro é o método de oxidação mais utilizado no Brasil. É eficiente na remoção de toxina da água, entretanto depende da dosagem a ser utilizada, da concentração, do tempo de exposição e do pH. O ozônio utilizado na pre-oxidação potencializa a remoção de células de cianobactérias.

Pesquisas realizadas relatam que a oxidação de toxina gera a produção de subprodutos que devem ser investigados afim de saber se há um grau de toxicidade. O permanganato de potássio é eficiente na remoção das toxinas microcistina e anatoxina-a, porém depende da dose e tempo de contato (Campinas et al., 2002).

8 Características dos locais de amostragem

8.1 Bacia do rio das Velhas

A Bacia do rio das Velhas é o maior afluente em extensão do rio São Francisco, desagua neste, na cidade da Barra do Guaçuí latitude $-17^{\circ} 12'44''$, longitude $-44^{\circ} 49'30''$, 480 de altitudeno município de Várzea da Palma. Sua nascente está localizada na cidade de Ouro Preto. Possui 801 km de comprimento, uma área 29173 km².Ocorrendo captação de água na Estação de tratamento de água na cidade de Bela Fama e Várzea da Palma. O rio sofre graves interferências na região Metropolitana de Belo Horizonte, recebendo enorme carga de esgoto através dos afluentes Ribeirão Arrudas e o Ribeirão do Onça, que por sua vez, atravessam a cidade de Belo Horizonte. Devido a presença de minério de ferro no solo da região as águas do rio das Velhas apresentam-se de cor avermelhada, excessivamente poluído e assoreado. É utilizado na irrigação da agricultura, na pecuária para dessedentação do gado e dragagem na região de Várzea da Palma (Melo Jardim, 2011; Nonato et al., 2007).

8.2 Bacia do rio São Francisco

A Bacia do rio São Francisco é um dos mais importantes cursos de água do Brasil, uma vez que atende a população no consumo de água e fornecimento de alimentos, seja este retirado do mesmo como o peixe e a utilização de irrigação da agricultura e dessedentação dos animais na pecuária, avicultura, suinocultura e outros. A nascente está localizada na cidade de Medeiros-MG, abrange uma área de drenagem em torno de 641.000 km² e atinge 2830 km de extensão,

passando pelo estados de Minas Gerais, Bahia, Pernambuco, Alagoas e Sergipe, desaguardo no oceano Atlântico. Há cinco usinas hidrelétricas. Em seu percurso diversos biomas são observados: Mata Atlântica, Cerrado e a Caatinga. A ocupação económica na região abrange atividade mineradora, siderurgia, agrícola, industrial têxtil e pecuária. As principais causas de degradação do Rio São Francisco são o avanço descontrolado da agricultura com intensiva irrigação com superexploração dos mananciais, desmatamento do Cerrado, supressão da mata ciliar, produção de carvão vegetal, barragens e hidrelétricas, mineração, siderurgia e a falta de saneamento básico na bacia, pois recebe grande carga de esgoto ao longo do seu percurso (Wikipedia/Bacia do rio São Francisco, 2014).

8.3 Represa de Furnas

A represa de Furnas é um dos maiores reservatórios do Brasil com 1.440 km² e 3500 km de perímetro, banha 34 municípios de Minas Gerais. Localizado na cidade do Carmo do Rio Claro com uma população estimada em 20.426 habitantes, com coordenadas geográficas de latitude 20°C 58'19''S, longitude 46°C 07'08''W, altitude 830m e área de 1.065,8 km². Com clima subtropical – invernos secos e verões úmidos. A temperatura média no inverno é aproximadamente 16°C e a média no mês mais quente fica por volta de 27°C. O período entre dezembro e fevereiro é quando mais chove. Os meses mais secos vão de abril a setembro. A represa de Furnas é afluente da Bacia do rio Grande, esta bacia, com 9 milhões de habitantes e 393 municípios, pertence ao Estados de Minas Gerais (região sul) e São Paulo (região norte). É uma bacia com grande diversidade de ambientes, além de possuir marcante potencial hidrelétrico já explorado em seu curso e diversas atividades do ramo da agroindústria. Segundo IGAM, 2011 é uma bacia em geral com IQA de médio a bom, além de uma contaminação por tóxicos de baixa a média (Wikipédia/Usina Hidrelétrica deFurnas, 2014).

8.4 Ribeirão São Pedro

Localizado na cidade de Medina-MG com uma população estimada em 14.493 habitantes na área urbana e de 7.148 habitantes na área rural, segundo IBGE 2010. Com coordenada geográfica de latitude 16° 31'21''S, longitude 41° 28'37''W, altitude de 587m e uma área de 1447km².O ribeirão são Pedro é um pequeno rio que abastece a cidade, sendo afluente do Rio

Jequitinhonhaque tem sua nascente situada na Cidade do Serro – Minas Gerais e deságua no Oceano Atlântico na cidade de Belmonte - Bahia. Possui um comprimento de 1090 km e uma área de 70.315 km². Atualmente foram construídas duas grandes barragens, uma em Itapebi no Sul da Bahia e a Usina hidrelétrica de Irapé localizado no município de Berilo – Minas Gerais (Wikipédia/ Medina-MG, 2014).

8.5 Lagoa dos Namorados

Localizado na cidade de Nanuque - MG com uma população estimada em 41.876 habitantes. Com coordenada geográfica de latitude 17° 50'21''S, longitude 40° 21'14''W, altitude 103m e área 1515,5 km². A lagoa dos Namorados é afluente da Bacia do rio Mucuri (Figura 18) que nasce em Malacacheta nordeste de Minas e desagua no Oceano Atlântico no Sul da Bahia, possui um comprimento de 446 km. Estende-se por 17 municípios e limita-se com outras bacias, dentre elas a Bacia do rio Jequitinhonha e a Bacia do rio Doce. Atualmente a principal atividade econômica é a pecuária e agricultura (Wikipédia/ Nanuque- MG, 2014).

8.6 Estação de tratamento de água residual de Matozinhos

A Estação de Tratamento de água residual de Matozinhos- MG localiza-se na latitude 19° 33' 28'' S, longitude 44°, 04'53'' W, altitude 812 m e área 253,6 km². Atende a uma população de 40.705 habitantes e tem capacidade de 111,8 L/s, tem como corpo recetor o Ribeirão da Mata e faz parte da bacia hidrográfica do rio das Velhas. Esse corpo recetor nasce no município de Matozinhos, após percorrer cerca de 80 quilômetros, deságua no rio das Velhas, no município de Santa Luzia. A estação de tratamento é composta dos tratamentos primário e secundário, portanto promove a remoção de sólidos grosseiros e de matéria orgânica, respectivamente. Pelo fato da ausência do tratamento terciário, no qual há remoção de agentes contaminantes, a COPASA é a empresa responsável pelo tratamento da água residual, monitoriza a toxicidade com testes ecotoxicológicos da água, atendendo à resolução 357/2005 do CONAMA. A unidade operacional possui duas lagoas anaeróbicas que, devido às suas menores dimensões e à maior profundidade, a fotossíntese ocorre lentamente, predominando, no entanto, as condições anaeróbicas, consumindo mais oxigênio do que produzindo, uma vez que, as bactérias anaeróbicas têm taxa metabólica e reprodução mais lenta do que as bactérias aeróbicas (Jardim, 2012)

8.7 Represa da Pampulha

É um reservatório urbano localizado na cidade de Belo Horizonte – MG (coordenadas UTM WGS84 607050, 7804600), foi construído em 1936 e tinha por objetivo inicial ampliar o abastecimento de água na região norte de Belo Horizonte e amenizar os efeitos das chuvas que causavam inundações. Porém nos anos 50 iniciou um crescimento populacional desordenado e a represa sofreu um grande e veloz processo de degradação, (assoreamento, descarga de esgoto doméstico e industrial). Como consequência, desde os anos 70 a represa é exposta a eutrofização, a partir daí surgiram as florações de cianobactérias e crescimento de macrófitas aquáticas. E na década de 80, após seguidas florações de Cianobactérias a represa da Pampulha perdeu a função de abastecimento público. Sua bacia hidrográfica compõe a bacia hidrográfica do rio das Velhas, que por sua vez, é afluente da bacia do rio São Francisco. A área total do reservatório possui 97,91 km² dividida entre os municípios de Belo Horizonte (44,9%) e Contagem (55,1%). Sua fluviografia inclui 40 córregos, dos quais 19 estão em Belo Horizonte e 21 no município de Contagem. O ribeirão Pampulha, onde está construído o reservatório, possui oito tributários diretos, com destaque para os afluentes Ressaca e Sarandi, que juntos respondem por cerca de 70% do aporte de água na lagoa da Pampulha (Resk, Bezerra-Neto & Pinto-Coelho, 2007).

9. Materiais e Métodos

9.1 Pontos de amostragem

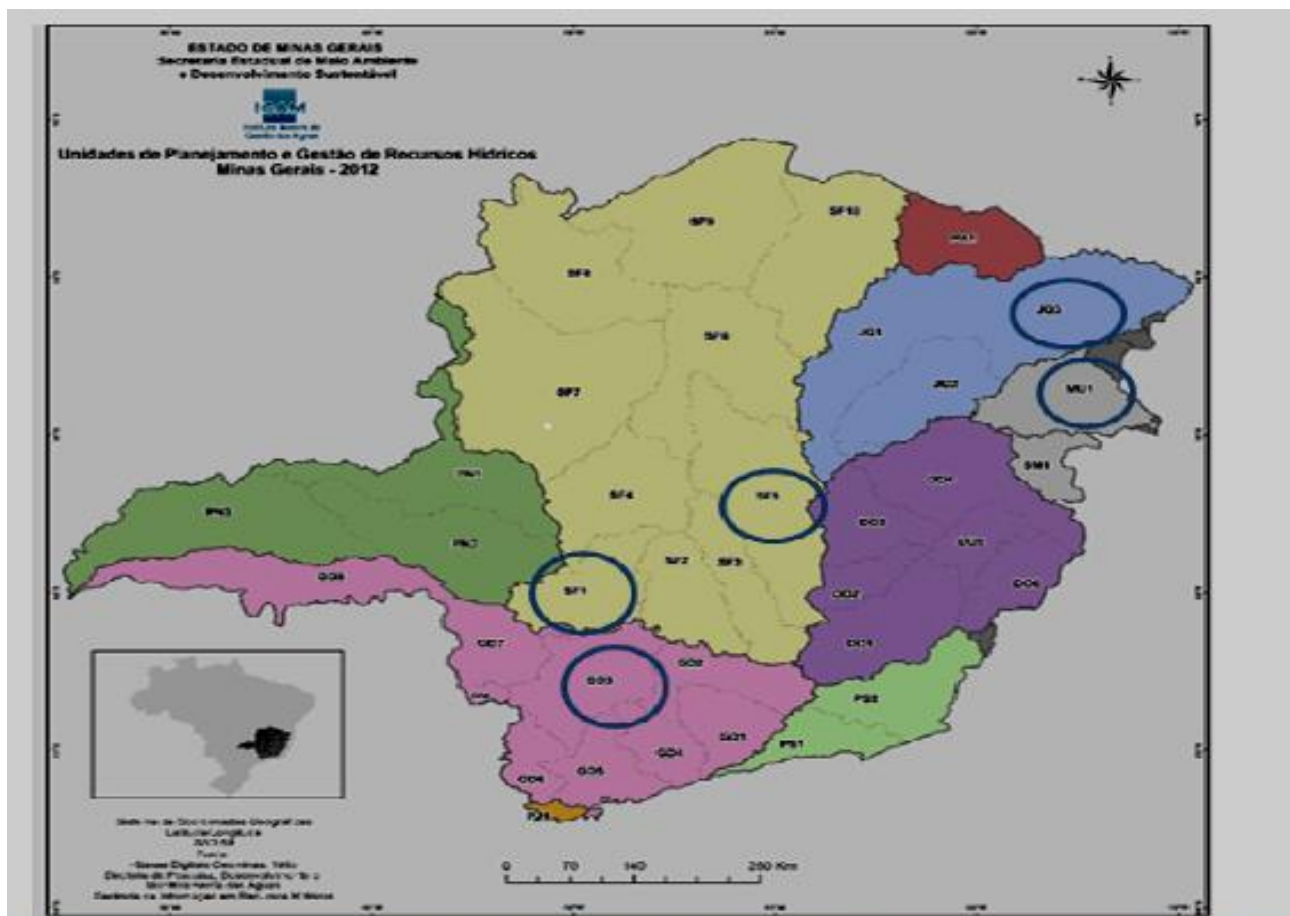


Fig. 7 - Representação dos pontos da amostragemFonte: IGAM, 2013

Tabela 5 - Identificação dos pontos da amostragem

CODIGO	LOCAL	CORPO HÍDRICO	BACIA HIDROGRÁFICA DE REFERÊNCIA
1 HBRP*	Belo Horizonte	Represa Pampulha	SF5 - Sub-bacia do rio das Velhas
2 HBRP*	Belo Horizonte	Represa Pampulha	SF5 - Sub-bacia do rio das Velhas
3 HBME*	Medina	Ribeirão São Pedro	JQ3 - Bacia do rio Jequitinhonha
4 HBNA*	Nanuque	Lagos dos Namorados	MU1 - Bacia dos rios do Leste - rio Mucuri
5 HBCL*	Carmo do Rio Claro	Represa de Furnas	GD3 - Bacia do rio Grande
6 HBCL*	Carmo do Rio Claro	Represa de Furnas	GD3 - Bacia do rio Grande
7 HBCL*	Carmo do Rio Claro	Represa de Furnas	GD3 - Bacia do rio Grande
8 HBRF**	Pirapora	Rio São Francisco	SF1 - Bacia do rio São Francisco
9 HBRF**	Pirapora	Rio São Francisco	SF1 - Bacia do rio São Francisco
10 HBRF**	Pirapora	Rio São Francisco	SF1 - Bacia do rio São Francisco
11 HBRP*	Belo Horizonte	Represa Pampulha	SF5 - Sub-bacia do rio das Velhas
12 HBRP*	Belo Horizonte	Represa Pampulha	SF5 - Sub-bacia do rio das Velhas
13 HBRP*	Belo Horizonte	Represa Pampulha	SF5 - Sub-bacia do rio das Velhas
14 HBRP*	Belo Horizonte	Represa Pampulha	SF5 - Sub-bacia do rio das Velhas
15 HBME*	Medina	Ribeirão São Pedro	JQ3 - Bacia do rio Jequitinhonha
16 HBRV**	Barra do Guacuí	Rio das Velhas	SF5 - Sub-bacia do rio das Velhas
17 HBVP**	Várzea da Palma	Rio das Velhas	SF5 - Sub-bacia do rio das Velhas
18 HBMT*	Matozinhos	ETE de Matozinhos	SF5 - Sub-bacia do rio das Velhas
19 HBLA*	Lassance	Rio das Velhas	SF5 - Sub-bacia do rio das Velhas
4 MMB**	Barra do Guacuí	Rio das Velhas	SF5 - Sub-bacia do rio das Velhas
9 MMB**	Barra do Guacuí	Rio das Velhas	SF5 - Sub-bacia do rio das Velhas

*Amostras cedidas pela COPASA, ** Amostras coletadas nos pontos de amostragem, (14HBRP, 17HBVP, 4MMB, 9MMB são amostras ambientais e as demais são isolados)

Os locais de amostragem (Figura 7) foram escolhidos com base nos problemas da contaminação da água por cianobactérias e suas toxinas, já registrados por empresas responsáveis pelo abastecimento de água potável e controle de lançamento de efluentes nos corpos d'água. Perante a legislação brasileira que dispõe das Resoluções e Portarias já citadas anteriormente, estabelece obrigatoriedade da vigilância nas análises para cianobactérias e suas toxinas para promoção da qualidade da água para consumo humano e para assegurar melhores condições à saúde pública.

As análises de identificação, isolamento, métodos analíticos e moleculares foram realizados parte no laboratório do Lege em Portugal e parte no laboratório de Hidrologia da COPASA em Belo Horizonte Minas Gerais.

Algumas amostras foram cedidas pelo Laboratório de Hidrologia da COPASA: Represa da Pampulha, Represa de Furnas, Ribeirão São Pedro, Lagoa dos namorados, efluente da ETE de Matozinhos, rio das Velhas no município de Lassance (Tabela 5).

As coletas foram realizadas nos períodos: 09/2012 no rio das velhas e rio São Francisco e na Estação de tratamento de água de Pirapora. Foram transportadas do Brasil a Portugal para o laboratório do Lege em condições esclarecidas abaixo. Nos meses de 05/2013 a 09/2013 as coletas foram reiniciadas no rio das Velhas, no rio São Francisco e Estação de tratamento de água nos municípios de Pirapora e Várzea da Palma em Minas Gerais e transportadas ao laboratório de Hidrologia da COPASA para identificação dos géneros, isolamento, cultivo das cianobactérias e análise de ELISA para cianotoxinas.

As amostras destinadas ao estudo qualitativo, quantitativo e para cultivo das cianobactérias foram obtidas através da coleta de água ambiental superficial com o auxílio de uma garrafa de vidro âmbar de 1000 ml e 100ml, exceto na primeira amostragem que foi coletada com a rede de plâncton (20µm) por arrasto, por se tratar de floração. Foram também realizadas coletas de água não tratada, tratada e do ponto de captação da Estação de tratamento de Água (ETA) no município de Pirapora referente ao rio São Francisco e no município de Várzea da Palma referente ao rio das Velhas. Em seguida foram armazenadas em caixa de isopor (esferovite) com gelo e transportadas ao laboratório de Hidrologia na COPASA. Amostras destinadas aos ensaios analíticos e moleculares foram congelados a -20°C. E amostras destinadas a análise de identificação e isolamento ficaram em temperatura ambiente.

9.2 Identificação dos géneros

No laboratório de Hidrologia da COPASA, as amostras destinadas a análise qualitativa foram transferidas para uma proveta de 1 litro e reservada em temperatura ambiente

por 12 horas para facilitar a captura de cianobactérias na superfície do recipiente. Foi utilizada tinta de nanquim para possibilitar a visualização da bainha mucilaginosa e assim permitiu distinguir alguns gêneros da ordem Chroococcales. Outro recurso utilizado para distinguir as cianobactérias das demais bactérias foi a microscopia por epifluorescência, pois a técnica possibilitou evidenciar a presença e ausência da clorofila nos microrganismos analisados. Em seguida as amostras foram analisadas a partir da montagem de lâminas e observadas sob um microscópio binocular da marca LEITZ, modelo Laborlux, ocular calibrada com régua micrométrica e um sistema de vídeo *printer* acoplado ao mesmo, permitindo o registo fotográfico das espécies encontradas. A identificação e nomenclatura dos gêneros foram baseadas nas características morfológicas de acordo com a literatura especializada de autores como: (Bicudo & Menezes, 2006; Sant'Anna et al 2006; Sant'Anna, 2012).

9.3 Isolamento e cultivo dos gêneros

Após identificação dos gêneros, ainda com o auxílio do microscópio foi realizada o isolamento por meio da técnica do capilar de vidro (pipeta de *Pasteur*) (Figura 8). A técnica consiste em succionar uma gota da amostra e depositar sobre uma lâmina com gotas de meio de cultura, em seguida com o auxílio do microscópio ótico foi realizada identificação e coleta do organismo, seja este colônia ou filamento e transferido para tubo de ensaio com meio de cultura ASM-1 com 100% de nitrato de sódio para os gêneros da ordem Chroococcales e Oscillatoriales e com o meio de cultura ASM-1 com 10% de nitrato de sódio para a ordem Nostocales. A disponibilidade da quantidade de nitrato de sódio referente a ordem das cianobactérias está relacionada com o desenvolvimento de células vegetativas (heterocito e acineto) em especial a ordem Nostocales. O tubo de ensaio com o inóculo foi transferido para estufa com temperatura $22-25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas e luminosidade de $40\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$. Com auxílio do microscópio foi observado o crescimento a cada dez dias. E permaneceram por volta de 30 a 45 dias até que o crescimento fosse visivelmente constatado e assim as repicagens foram realizadas para volumes de 250ml, 500ml e 1000ml de meio de cultura e armazenado em estufa. Com o objetivo de identificar a presença de toxinas e determinar qual a espécie produtora da toxina identificada, as amostras foram filtradas e as células retidas na membrana foram

envolvidas em papel alumínio e congeladas a -20°C por 24h. Em seguida as amostras foram transportadas via correio do Brasil para o laboratório Lege em Portugal. E armazenada a -20°C para integridade da amostra.

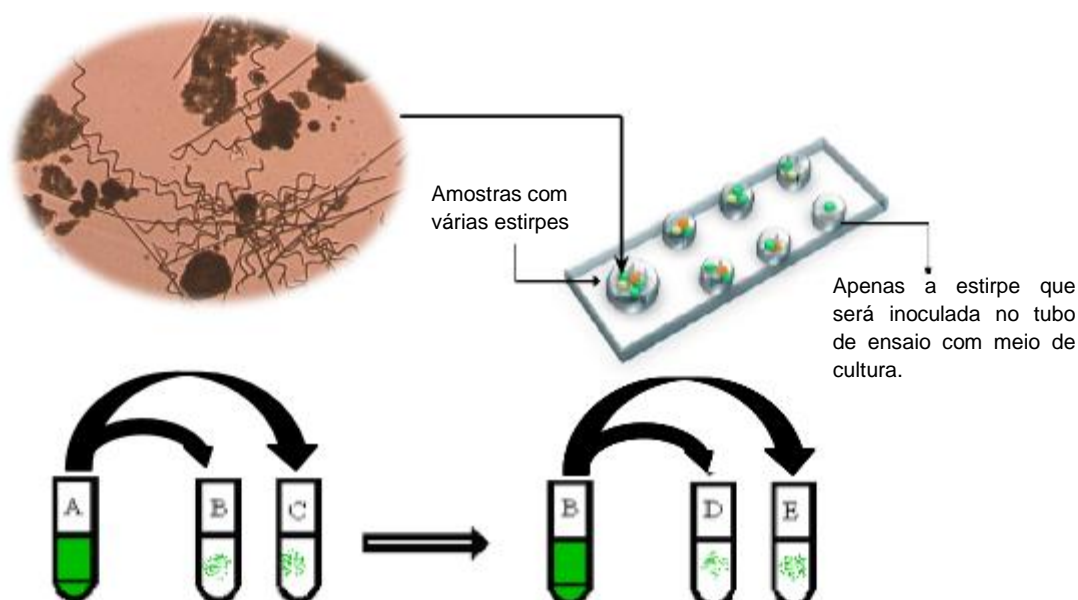


Fig. 8 Técnica de isolamento

9.4 Determinação de cianotoxina na água pela técnica de ELISA

A técnica foi realizada com amostras de água não tratada e tratada das ETAs, com amostras de culturas e amostras ambientais (Tabela 5). Foi utilizado o volume de 50 a 15 mL da amostra, em seguida a amostra foi congelada e descongelada três vezes com o objetivo de facilitar a lise das células. Para as amostras de cultura e ambientais, além do congelamento e descongelamento foi utilizado o sonicador para rompimento das células. A quantificação da toxina foi realizada com o kit comercial ELISA da *Beacon Analytical Systems Inc[®]*, Portland, ME, USA), seguindo o protocolo do fabricante. Foi analisada a toxicidade das amostras para as toxinas microcistina, saxitoxina e cilindrospermopsina. A detecção limite para as toxinas por ELISA foi 0.1

ppb, 0.02ppb e 0.1ppb respectivamente. Os controles positivo e negativo foram fornecidos respectivamente no kit comercial Elisa da *Beacon*. Foi utilizado 50µL solução conjugado – enzima conforme a toxina analisada, em seguida 50µL dos calibradores, controle negativo e as amostras. Logo pipetou 50 µL de solução anticorpo. Foi realizado a agitação da placa para homogeneização da solução e em seguida cobriu a placa com parafilme e incubou em temperatura ambiente no tempo determinado para cada toxina que varia entre 30 e 45 minutos. Após incubação, o conteúdo dos poços foi desprezado e na sequência os poços foram lavados com a solução enxágue disponível no kit e específico para cada toxina, em seguida a placa foi colocada invertida sobre uma folha de papel absorvente para eliminar o máximo de água possível. Foi adicionado em seguida 100µL da solução substrato em cada poço e incubou em temperatura ambiente no tempo determinado para cada toxina que varia entre 30 e 45 minutos. Nesse período ocorreu a mudança de cor na solução para um tom azulado. A intensidade da cor azulada é inversamente proporcional a concentração da toxina presente nos poços (mais claro, maior concentração de toxina. Mais escuro, menor concentração de toxina). E para finalizar pipetou 100µL de solução stop em cada poço e encaminhou a placa para o leitor de placa ELISA para medir a absorbância com um comprimento de onda de 450nm.

9.5 Extração, detecção e quantificação de microcistina por HPLC-PDA

Amostra ambiental

Primeiramente, as amostras ambientais(4MMB e 9MMB) (Tabela 5) do rio das Velhas foram medidas em proveta, em seguida filtrada em filtro de membrana de 1,2µm para coleta das células. Os filtros foram reservados porque se pretendia extrair a toxina das células. Foram adicionados aos filtros 2ml de metanol a 50% até cobrir os filtros. Logo foram macerados até atingir a homogeneização e em seguida sonicados (*Vibra cell –sonics e materials Inc., Danbury, CT, USA*), por um período de 5 minutos a 60 Hz, em banho de gelo, com intervalos a cada 1 minuto para não degradar a toxina. Foi

encaminhado para acentrífuga (*Survall Legend RT Centrifuge da Thermo Electron Corporation*) a uma velocidade de $4495g - 10\text{min} - 4^{\circ}\text{C}$ e coletado o sobrenadante e reservado no frigorífico envolvido em papel alumínio. Foi adicionado ao *pellet* metanol 50% e reservado no frigorífico *overnight*, repetindo-se esse procedimento por duas vezes, para assegurar a extração total da microcistina. Em seguida foi encaminhada a amostra para o rotavapor ou speedvac (Labconco) para evaporar o metanol. Após evaporar o metanol foi realizado o procedimento de purificação com o método de extração da fase sólida (SPE) com Cartuchos Vac C18-500mg, 6mL (Tabela 6). As frações purificadas de MC – LR foram então quantificadas no sistema de HPLC numa coluna de terminação protegida *Merck Lichrospher RP – 18* (250 mm x 4.6 mm i.d., $5\mu\text{m}$) equipado com uma coluna de guarda (4x4 mm, $5\mu\text{m}$), ambos mantidos a 45°C . A gama de PDA foi de 210-400 nm com um comprimento de onda fixo de 238 nm. O gradiente de eluição linear foi realizado conforme (Tabela 7) com um caudal de 0.9 mL/min. O volume injetado foi de 20 μL . O MC – LR foi identificado por comparação do espectro e tempo de retenção com um padrão de MC – LR. O sistema foi calibrado usando um conjunto de sete diluições padrão de MC – LR (05 a 20 $\mu\text{g} / \text{mL}^{-1}$) em metanol 50%. O tempo de retenção do pico de MC – LR foi de 9.5 min.

Tabela 6 - Método de extração da fase sólida

Solvente	Passo	Volume (mL)
MeOH 100%	Passo 1	20
H ₂ O	Passo 2	20
MeOH 20%	Passo 3	20
H ₂ O ou MeOH 100%	Aplicação da amostra	<15
MeOH 20%	Enxague	20
MeOH 80%	Eluição	10

Condições do HPLC

Fase móvel

A – MeOH + 0,1% TFA (ácido trifluoroacético)

B – Água ultra pura + 0,1% TFA (ácido trifluoroacético)

Tabela 7 - Programa do gradiente de eluição

Tempo (min)	Canal A MeOH (%)	Canal B Água ultra pura (%)
0	55	45
5	65	35
10	80	20
15	100	0
15.1	55	45
20	55	45

9.6 Extração, detecção e quantificação de cilindropermopsina por HPLC-PDA

Realizada com a amostra ambiental 4MMB e 9MMB do rio das velhas da cidade da Barra do Guacuí (Tabela 5). A amostra foi liofilizada. A detecção e quantificação de cilindropermopsina, foi realizada da mesma maneira que para a amostra de Microcistina, entretanto foi utilizado como solvente de extração, água com Ácido Trifluoroacético (ATF a 0.1%). As frações purificadas de cilindropermopsina foram então quantificadas no *Water Alliance e2695 sistema de HPLC acoplado com um PDA 2998* numa coluna fase Atlantis® HILLIC (250 mm x 4,6 mm i.d., 5 µm) da *waters* a 40°C. A gama de PDA foi de 210-400 nm com um comprimento de onda fixo de 262 nm. A eluição isocrática foi também uma solução de metanol a 50% contendo 2 mM de sódio 1- heptanosulfonato mono – hidratado (99%) com um fluxo de 0,9 mL/min e um volume injetado foi de 20 µL. O sistema foi calibrado usando um conjunto de sete diluições padrão de cilindropermopsina (0,08 a 0,5 µg/mL⁻¹) em água ultrapura. O tempo de retenção do pico de cilindropermopsina foi de 7,35 min.

9.7 Extração do DNA

Amostras do cultivo

Foram utilizadas amostras de células aderidas ao filtro de membrana que foram congeladas previamente a -20°C para manter a integridade da amostra (Tabela 5). Para iniciar o processo de extração foi usado uma pinça e um bisturi para realizar a raspagem dos filtros (descongelados). O material (células) foi colhido em uma placa de petri e posteriormente, transferido para um eppendorf. Em seguida foi utilizado o kit *Purelink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen)*, tendo seguido as indicações do fabricante para a extração de DNA genômico (Figura 9). Foi adicionado na amostra $540\mu\text{L}$ de *buffer (genomic digestion)* e $60\mu\text{L}$ de proteinase K homogeneizou e incubou no Eppendorf *Thermomixer Compact* a 55°C *overnight*. Foi adicionado $20\mu\text{L}$ de RNase A vortexou e incubou durante 2 min a temperatura ambiente. Adicionou $200\mu\text{L}$ genomic lysis/Binding Buffer e vortexou. Adicionou $200\mu\text{L}$ 96-100% etanol vortexou durante 5 segundos. Foi adicionado $640\mu\text{L}$ da solução *lysate* homogeneizou e centrifugou a $10,000\text{ g}$ por 1 minuto na temperatura ambiente. Em seguida a amostra foi lavada por duas vezes com $500\mu\text{L}$ da solução de lavagem e centrifugado a $10,000\text{ g}$ por 1 minuto na temperatura ambiente e descartado o tubo coletor. Logo adicionou $200\mu\text{L}$ do tampão de eluição incubou por 1 minuto na temperatura ambiente e centrifugou $16,000\text{ g}$ por 1 minuto, descartou o tubo coletor e preservou o tubo com o DNA extraído que foi armazenado no frigorífico na temperatura -20°C para integridade do material genético.

Amostra ambiental

Amostra com volume de 100ml foi homogeneizado e colhido 2ml para um eppendorf, encaminhado a centrífuga Eppendorf 5415R durante 5 min em rotação 16000g. Em seguida coletou o *pellet*. Foi utilizado o kit *Purelink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen)*, tendo seguido as indicações do fabricante para a extração de DNA genômico (Figura 8). O *pellet* foi suspenso em $180\mu\text{L}$ (*genomic digestion buffer*). Logo foi adicionado $20\mu\text{L}$ de proteinase K, homogeneizou e incubou no Eppendorf *Thermomixer Compact* a 55°C *overnight*. Foi adicionado $20\mu\text{L}$ de RNase A vortexou e incubou durante 2 min a temperatura ambiente. Adicionou $200\mu\text{L}$ genomic lysis/Binding Buffer e vortexou. Adicionou $200\mu\text{L}$ 96-100% etanol vortexou durante 5 segundos. Foi adicionado $640\mu\text{L}$

da solução *lysat* homogeneizou e centrifugou a 10.000 g por 1 minuto na temperatura ambiente. Em seguida a amostra foi lavada por duas vezes com 500µL da solução de lavagem e centrifugado a 10.000 g por 1 minuto na temperatura ambiente e descartado o tubo coletor. Logo adicionou 200 µL do tampão de eluição incubou por 1 minuto na temperatura ambiente e centrifugou 16.000 g por 1 minuto, descartou o tubo coletor e preservou o tubo com o DNA extraído que foi armazenado no frigorífico na temperatura -20°C para integridade do material genético. Em seguida O marcador utilizado no trabalho foi o 1Kb plus DNA Ladder da Invitrogen (fragmentos de 100 bp a 12 Kb).

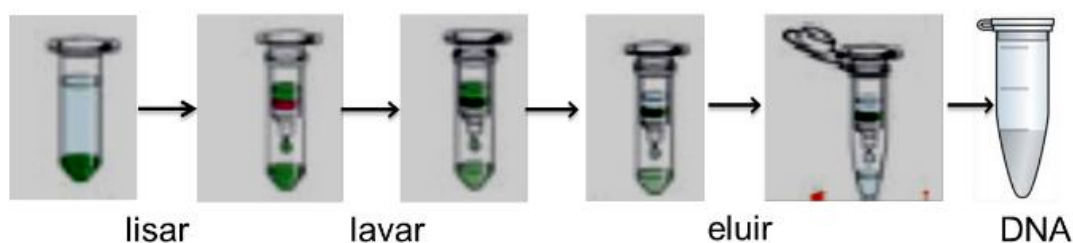


Fig. 9 Purificação de DNA por adsorção em coluna

9.8 Amplificação do PCR

O PCR foi usado na detecção de genes específicos para cianobactérias com amostras ambientais e isolados obtidos. Para além foi utilizado na detecção de genes codificadores de cianotoxinas. Os genes utilizados no presente estudo encontram-se listados na (tabela 5). Nas realizações do PCR foram utilizados par de primers num volume final de 20µl. Os reagentes foram obtidos através da Promega (Madison WI, USA). Cada reação de PCR se utilizou: 1x Go Taq buffer, 2,5 mM de MgCl₂, 10.0 pmol de cada primer, 125 µM de dNTP's, 0,5 U de GoTaq^R Flexi DNA polimerase e 10 ng de DNA utilizadas tanto nas amostras ambientais como nos isolados. As reações realizaram-se no termociclador (Biometra Profissional Thermocycler). A amplificação do PCR foi confirmada por eletroforese num gel de agarose (UltrapureTM Agarose, Invitrogen) a 1,5% seguindo os procedimentos *standard* da eletroforese utilizando uma solução de tampão de Tris-Acetato EDTA (TAE 1%, BioRad-40mM ácido acético, 1mM EDTA, pH 8,3). A voltagem usada foi de 100 Volts num período de 30 minutos.

Em princípio foi adicionado ao gel de agarose 3 µl de brometo de etídio (BioRad) de uma solução stock de 10 mg/ml. Foram carregados nos poços de gel 10µl de DNA.

9.9 Sequenciamento

Foi realizada amplificação do PCR dos fragmentos do gene específico para anatoxina-a com os primers anac gen forward (5'TCTGGTATTTCAGTCCCCTCTAT 3')anac gen reverse (5'CCCAATAGCCTGTCATCAA3')(Tabela 6). A reação de PCR foi preparada para um volume final de 40µL por amostra. Manteve-se a mesma proporção de reagentes na realização do PCR de modo a efetivar esta reação. A amplificação foi validada através da eletroforese de gel Red a 1%. A partir daí, os fragmentos que continham somente uma banda foram submetidos a um processo de purificação a partir do *kit Rapid Tip for PCR Purification – Diffinity genomics - Made in USA*. Foi coletado 25µL da amostra de PCR e em seguida o tratamento foi realizado conforme o protocolo do fabricante. Logo, foi feito um mix da amostra tratada com opar de primers específicos (anac gen F e anac gen R), ou seja, 5µL da amostra de PCR tratada e 5µL de cada primer separadamente. E em *seguida* foram identificados (etiquetados) conforme normas do laboratório responsável pelo sequenciamento e encaminhado ao mesmo.

9.10 Análise filogenética

Afim de conhecer o grau de similaridade em um contexto filogenético das sequências de anatoxina-a das amostras estudadas, foi usado o programa Mega 6.06 (6140226). A árvore filogenética foi calculada usando a metodologia de estatística *Maximum Likelihood Tree*. O teste foi realizado a partir da metodologia *Bootstrap* com base em 100 replicações, utilizando o modelo Tamura – Nei. Cada sequência foi usado de forma independente com a consulta em uma pesquisa *BLAST* no banco de dados de nucleotídeos do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Ocorrência de cianobactérias e cianotoxinas na água de cinco importantes
rios no Estado de Minas Gerais - Brasil

Tabela 8 Caracterização dos genes alvos utilizados no PCR ao longo do presente estudo.

Gene alvo	Par de Primers	Sequência do primer (5'- 3')	Tamanho (bp)	Controlo positivos	Reação de PCR			Referência
					Desnaturação	Hibridização	Extensão	
16S rRNA	27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	780	-	92°C	35 ciclos 92°C-20s, 50°C-30s, 72°C-1min	72°C	Neilan et al., 1997; Nubel et al., 1997
	809R	GCTTCGGCACGGCTCGGGTCGATA			2min		5min	
	740F	GGCYRWAAGCTGACACTSAGGGA	754	-				Lopes et al., 2012
1494R	TACGGCTACCTTGTTACGAC							
gyrB	gyrF	GGACGTTTACGAGAACTAGCCTA	416	IZ 21	94°C	40 ciclos	72°C	Tanabe et al., 2007
	gyr R	GGTCTTGGTTTGCCCTCAA			3min	94°C-60s, 60°C-60s, 72°C-30s	5min	
rpoC1	PlankF271	GTTAAATCCAGGTAAC TATGACGGCCTA	201	-	94°C	40 ciclos	72°C	Churro, 2012
	PlankR472	GCGTTTTTGTCCTTAGCAAC GGT			3min	94°C-20s, 58°C-20s, 72°C-20s	5min	
rpC1	Cyl 2	GGCATTCTAGTTATATTGCCATACTA	308	AQS	95°C	35 ciclos	72°C	Wilson et al., 2000
	Cyl 4	GCCCGTTTTTGTCCTTTCTGTGC			2min	95°C-90s, 45°C-30s, 72°C-50s	7min	
sxtI	sxtI 682F	GGATCTTCAAAGAAGATGGCA	200	MEcyA40	94°C	35 ciclos	72°C	Lopes et al., 2012
	sxtI 877R	GCCAAACGCAGTACCACTT			3min	94°C-10s, 52°C-20s, 72°C-60s	7min	
sxtI	sxtI F	GGATCTCAAAGAAGATGGCA	1669	MEcyA40	94°C	35 ciclos	72°C	Brito et al., 2012; Kellman et al., 2008
	sxtI R	GGTTCGCCGCGGACATTAA			3min	94°C-10s, 60°C-20s, 72°C-60s	7min	

Ocorrência de cianobactérias e cianotoxinas na água de cinco importantes rios no Estado de Minas Gerais - Brasil

cyrB	M13 M14	GGCAAATTGTGATAGCCACGAGC GATGGAACATCGCTCACTGGTG	597	AQS	95°C 2 min	35 ciclos 95°C-90s, 55°C-30s, 72°C-50s	72°C 7min	Alterado de Schembri et al., 2001
cyrC	M4 M5	GAAGCTCTGGAATCCGGTAA AATCCTTACGGGATCCGGTGC	650	AQS				Schembri et al., 2001
mcyA	Cd1F Cd1R	AAAATTAAAGCCGATCAAA AAAAGTGTTTTATTAGCGGCTCAT	297	IZ 2	95°C 2min	35 ciclos 95°C-1'30s, 56°C-30s, 72°C-50	72°C 7min	Hisbergues et al., 2003
mcyB	2156F 3111R	ATCACTTCAATCTAACGACT AGTTGCTGCTGTAAGAAA	955		94°C 5min	35 ciclos 95°C-60s, 52°C-30s, 72°C-60s	72°C 7min	Quahid et al., 2005
mcyC	PSCF1 PSCR1	GCAACATCCCAAGAGCAAAG CCGACAACATCACAAAGGC	674					
mcyD	PKDF1 PKDR1	GACGCTCAAATGATGAAAC GCAACCGATAAAAACTCCC	647					
mcyE	PKEF1 PKER1	CGCAAACCCGATTACAG CCCCTACCATCTTCATCTTC	755					
mcyG	PKGf1 PKGR1	ACTCTCAAGTTATCCTCCCTC AATCGCTAAAACGCCACC	425					
anaC	anac genF anac genR	TCTGGTATTCAGTCCCTCTAT CCCAATAGCCTGTCATCAA	366	gDNA309	94°C 2min	35 ciclos 94°C-30s, 58°C-30s, 72°C-30s	72°C 5min	RantalaYlinen et al., 2011

Controlos positivos: IZ 21- Estirpe *Microcystis aeruginosa*; IZ 2 – Estirpe *Microcystis aeruginosa*;

MEcyA 40 – Estirpe *Aphanizomenon gracile*; AQS – Estirpe *Cylindrospermopsis raciborskii*

gDNA 309 – Estirpe *Anabaena* sp. 37 Legex-002

10. Resultado e discussão

10.1 Identificação dos gêneros

A partir das análises qualitativas das amostras, observaram-se variados gêneros de cianobactérias, como: *Sphaerocavum*, *Microcystis*, *Arthrospira*, *Planktothrix*, *Geitlerinema*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Dolichospermum*, *Oscillatoria*, *Radiocystis* (Figura 11). Em alguns dos estudos realizados em Minas Gerais, os mesmos gêneros foram referenciados por (Jardim et al., 2008; Jardim, Carvalho & Couto, 2010; Jardim et al., 2011) e para além, também foram relatados a presença do gênero *Anabaena* (Jardim & Viana, 2003; Jardim et al., 2007). Em São Paulo no alto Tietê Sant'Anna et al., (2007) relata a ocorrência de cianobactérias em cinco reservatórios analisados no período de seis anos, foram catalogados os gêneros *Microcystis*, *Sphaerocavum*, *Radiocystis*, *Synechocystis*, *Synechococcus*, *Merismopedia*, *Aphanocapsa*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Raphidiopsis*, *Geitlerinema*, *Limnothrix*, *Planktothrix*. No nordeste do Brasil no Estado do Pernambuco, Bittencourt-Oliveira et al., (2014) observou *Microcystis*, *Planktothrix*, *Cylindrospermopsis*, *Geitlerinema*, *Sphaerospermopsis* e *Merismopedia*. A ocorrência de florações de cianobactérias em corpos d'água para abastecimento público tem sido cada vez mais frequente, favorecido pela situação do ambiente, que se encontra eutrofizado, rico em nutrientes, como o fósforo e o nitrogênio (Barreto et al., 2013). O clima da região tropical também é um fator que estimula o desenvolvimento das cianobactérias. Encontra-se duas estações, uma fria e seca no período do inverno que corresponde aos meses de abril a setembro e outra quente e chuvosa no período do verão nos meses de outubro a março. Entretanto, as florações ocorrem em diversas regiões do mundo, inclusive no clima temperado. A temperatura e pH também são fatores importantes para a proliferação das cianobactérias. Segundo Muller e colaboradores, (2009) os gêneros de cianobactérias que se destacam são *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Planktothrix*, *Cylindrospermopsis* e *Nodularia*, correspondendo algumas das estirpes encontradas ao longo do trabalho realizado.

10.2 Isolamento e cultura dos géneros

Dentre os géneros cultivados, as condições laboratoriais foram favoráveis para o crescimento das cianobactérias da ordem Nostocales 53%, seguida pela ordem Oscillatoriales 35% e logo pela Chroococcales 12% (Figura 10). Na ordem Nostocales destacaram-se *Cylindrospermopsis* e *Aphanizomenon*. Na ordem Oscillatoriales houve crescimento favorável do *Planktothrix*, *Arthrospira* e *Geitlerinema*. Já para as Chroococcales ocorreu crescimento somente para o género *Microcystis*. Segundo técnicas desenvolvidas para procedimentos de isolamento, é aconselhável que para tal procedimento devem ser utilizado uma variabilidade de meio de cultura para garantir melhor resultado, a não ser que já conheça previamente qual o melhor meio para o cultivo da estirpe de interesse. Porém para as culturas deste trabalho foi usado somente o meio ASM-1 com nitrogénio e ASM-1 com 10% de nitrogénio. O meio de cultura com 10% de nitrogénio seria para induzir as Nostocales a desenvolverem as células especiais, como heterocito e acineto. Pois, a formação dos heterocitos está relacionada ao teor de nitrogénio do meio, quanto mais baixa a concentração de nitrogénio, maior o número de heterocitos formados para promover a fixação de nitrogénio (Sant'Anna et al., 2006). E muitas das espécies da ordem Nostocales são identificadas morfológicamente a partir da formação e localização do heterocito (Figura 11 C e I). Por exemplo, *Cylindrospermopsis* tem tricomas com heterocitos terminais e acinetos subterminais. O género *Aphanizomenon* possui heterocitos (Figura 11 G) e acinetos subterminais com tricoma atenuados. Portanto, as cianobactérias que possuem para além das células vegetativas as células especiais (heterocito e acineto), são denominados heterocitados. As demais cianobactérias filamentosas com apenas células vegetativas são chamadas de homocitados, como o género *Planktothrix* (Sant'Anna et al., 2006). O procedimento de isolamento, cultivo e manutenção de estirpes em laboratório podem promover a seleção de linhagens, conforme o metabolismo mais adequado para as condições laboratoriais oferecidas, tais como; concentrações de nutrientes, intensidade luminosa, altas temperaturas e altos valores de pH; podendo dessa forma selecionar estirpes tóxicas ou não tóxicas (Bittencourt-Oliveira, 2003).

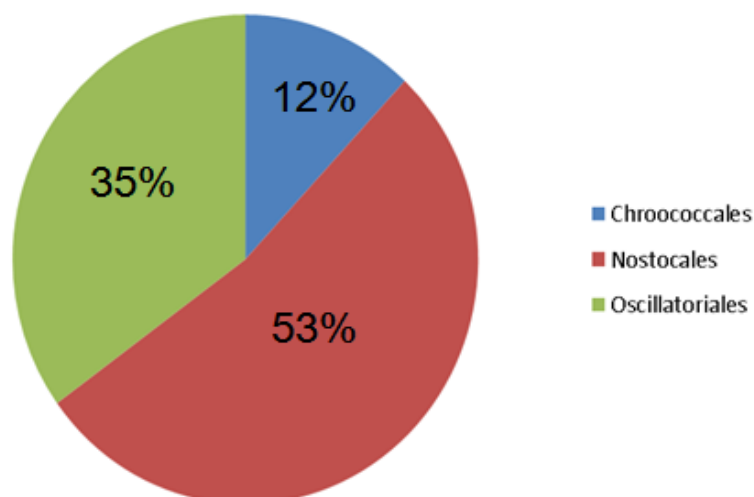


Fig. 10 Distribuição das cianobactérias isoladas no presente estudo

Tabela 9 Estirpes identificadas e submetidas a cultura.

CODIGO	LOCAL	CORPO HÍDRICO	ESTIRPES
1 HBRP	Belo Horizonte	Represa Pampulha	<i>Microcystis aeruginosa</i>
2 HBRP	Belo Horizonte	Represa Pampulha	<i>Cylindrospermopsis spp</i>
3 HBME	Medina	Ribeirão São Pedro	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>
4 HBNA	Nanuque	Lagos dos Namorados	<i>Cylindrospermopsis spp</i>
5 HBCL	Carmo do Rio Claro	Represa de Furnas	<i>Cylindrospermopsis spp</i>
6 HBCL	Carmo do Rio Claro	Represa de Furnas	<i>Cylindrospermopsis spp</i>
7 HBCL	Carmo do Rio Claro	Represa de Furnas	<i>Aphanizomenon spp</i>
8 HBRF	Pirapora	Rio São Francisco	<i>Cylindrospermopsis spp</i>
9 HBRF	Pirapora	Rio São Francisco	<i>Aphanizomenon spp</i>
10 HBRF	Pirapora	Rio São Francisco	<i>Cylindrospermopsis spp</i>
11 HBRP	Belo Horizonte	Represa Pampulha	<i>Geitlerinema spp</i>
12 HBRP	Belo Horizonte	Represa Pampulha	<i>Arthospira spp</i>
13 HBRP	Belo Horizonte	Represa Pampulha	<i>Planktothrix agardhii</i>
14 HBRP	Belo Horizonte	Represa Pampulha	<i>Microcystis sp.</i> , <i>Microcystis aeruginosa</i> , <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>
15 HBME	Medina	Ribeirão São Pedro	<i>Geitlerinema spp</i>
16 HBRV	B.Guacuí	Rio das Velhas	<i>Microcystis aeruginosa</i>
17 HBVP	V. Palma	Rio das Velhas	<i>Microcystis sp.</i> , <i>Microcystis aeruginosa</i>
18 HBMT	Matozinhos	ETE de Matozinhos	<i>Planktothrix agardhii</i>
19 HBLA	Lassance	Rio das Velhas	<i>Arthospira spp</i>

Obs.: Amostras 14 e 17 referem-se a amostras ambientais e as demais amostras são isolados.

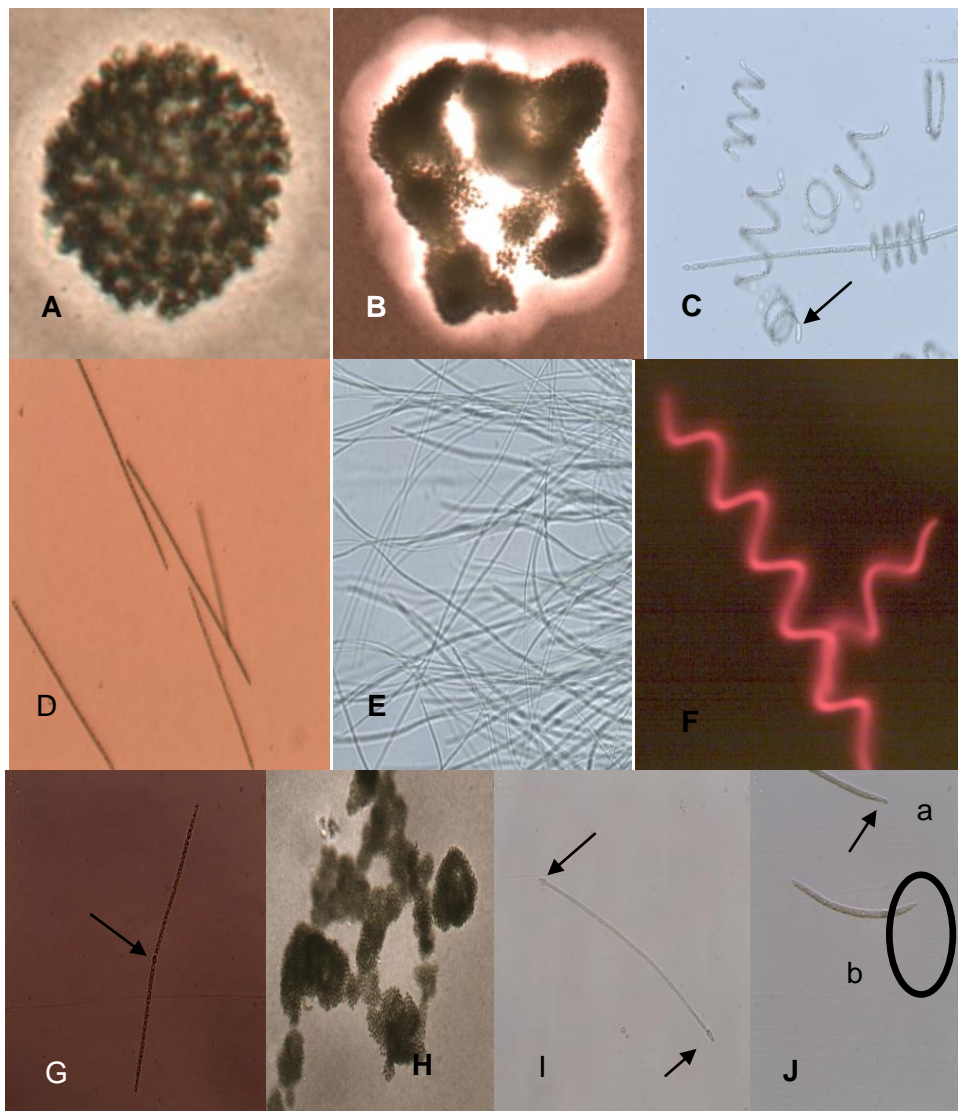


Fig. 11. Microfotografias óptica da morfologia dos géneros de cianobactérias, representando a diversidade nos rios de Minas Gerais. A. *Microcystis aeruginosa* (200x) rio das Velhas (bainha de mucilagem marcada pelo uso do nanquim); B. *Microcystis aeruginosa* (200x) Represa Pampulha (bainha de mucilagem marcada pelo uso do nanquim); C. *Cylandrospermopsis* sp. (400x) Bacia do Mucuri (presença de heterocito); D. *Planktothrix agardhii* (200x) Represa Pampulha; E. *Geitlerinema* sp. (200x); F. *Arthrospira* sp. (200x) Represa Pampulha (foto com epifluorescência); G. *Aphanizomenon* sp. (400x) Represa de Furnas (presença de heterocito intercalar); H. *Sphaerocavum* sp. (200x) rio das Velhas; I. *Cylandrospermopsis raciborskii* (400x) Represa Pampulha (presença de heterocitos terminais); J. *Cylandrospermopsis raciborskii* (200x) rio São Francisco (a. Presença do heterocito; b. Formação do heterocito).

10.3 Determinação de cianotoxina na água pela técnica ELISA

As análises realizadas pela técnica de ELISA demonstraram-se resultados positivos para microcistina. Para as primeiras amostras coletadas em (09/2012) foram identificadas as concentrações de microcistina em diferentes pontos do rio das Velhas. Foram identificadas concentrações de 0.2µg/L para amostra 4MMB e 0.4µg/L para a amostra 9MMB ambas amostras ambientais. E nas demais coletas realizadas em (05/2013 a 09/2013) foram identificadas na amostrado rio das Velhas (amostra 16HBRV) concentrações de toxina que variou de 1.4µg/L a 5.9µg/L e da represa da Pampulha (amostra 14HBRP) onde tiveram o valor de 0.9µg/L e em ambas amostras foram identificados através da análise de microscopia o gênero *Microcystis*. Na região já foram relatadas florações intensas causadas pelo gênero da *Microcystis*. Segundo Jardim et al., (2008) no rio das Velhas houve floração e as análises realizadas com o teste ELISA quantificou uma concentração de 38µg/L de microcistina-LR, e foi visível a contaminação das águas pela mudança no seu aspecto organoléptico. Naquela altura a população ribeirinha, pescadores e população da região foram advertidos a não fazerem o uso do peixe e a não manterem contato com a água, quer fosse para beber ou para recreação. Ao longo do percurso do rio das Velhas é intenso a ação do homem dentro e fora do rio, com a prática de dragagem, fazendo ressuspender nutrientes dos sedimentos para a superfície do rio, o uso de fertilizantes na agricultura, esgotos industrial e doméstico liberados no corpo d'água. Gerando consequências como a eutrofização e desencadeando a proliferação das cianobactérias (Nonato, 2007). Segundo Bittencourt-Oliveira et al., (2014) relata em seu trabalho realizado no nordeste do Brasil, no Estado de Pernambuco em dez reservatórios destinados ao abastecimento público, onde através da técnica ELISA vinte e três amostras foram analisadas e destas, vinte e duas foram positivas para microcistina. Em clima temperado também há relatos de cianobactérias potencialmente tóxicas. Pois a ocorrência de florações de cianobactérias tóxicas não é um fenômeno local, regional ou específico de um país, mas de proporção mundial (Chorus & Bartram, 1999). Segundo Vasconcelos e col., (2011) no reservatório de Aguieira em Portugal detetaram concentrações de microcistina-LR que variou entre 0,3µg/L a 87µg/L no período de 1998 a 2001, sendo a *Microcystis aeruginosa* a espécie dominante nos

reservatórios em Portugal. Para os testes realizados com as amostras das Estações de tratamento de água nas regiões de Pirapora-MG e Várzea da Palma-MG os resultados ficaram abaixo do indicado pela legislação brasileira, portaria 2914/2011, que determina limite máximo permitido de 1µg/L para microcistina. Sendo assim, pode-se afirmar que o tratamento realizado nas ETAs houve eficiência na remoção da microcistina e a água tratada não oferece risco a saúde pública, entretanto foi possível verificar uma libertação de toxina na água tratada que não havia na água bruta (Tabela 10), indicando assim, que pode ter ocorrido rompimento de células durante o tratamento da água, talvez no momento da dosagem do cloro na fase de desinfecção. Segundo Cybis, (2009) a lise das células pode ocorrer de forma natural, a partir da senescência ou devido ao uso de produtos químicos, como por exemplo o uso de algicida, ou ainda pela ação mecânica (turbulência e bombeamento) que ocorrem nas etapas de procedimento no tratamento da água. Portanto, os sistemas de tratamento que promove a lise das células apresentam um grande risco na libertação de cianotoxinas na água, podendo gerar um dano à saúde pública. Ambas as Estações de tratamento de água do presente trabalho usam o carvão ativado antracito para além do tratamento convencional. Em Pirapora-MG a captação do sistema de abastecimento de água ocorre no rio São Francisco. Há duas estações de tratamento de água, uma delas está localizada no centro da cidade (ETA I) que opera com uma vazão média de 120 litros/seg e a outra localizada no Distrito Industrial (ETA II) que opera uma vazão média de 160 litros/seg. Já em Várzea da Palma-MG a captação ocorre no rio das Velhas afluente do rio São Francisco. A estação de tratamento de água opera com uma vazão média de 86 Litros/seg. Ambos os rios recebem esgotos doméstico e industrial, há o manejo de agricultura e pecuária nas regiões e também ocorrem os processos de dragagem, ocasionando assim, a eutrofização desses rios e consequentemente a proliferação das cianobactérias. A microcistina é a toxina mais recorrente em corpos hídricos no Brasil, e foi a causa fundamental para a síndrome que ocorreu na clínica de hemodiálise em Caruaru/ Pernambuco em 1996, que pela primeira vez foi confirmada a morte de seres humanos ocasionada por cianotoxina (Azevedo et al., 2002; Carmichael et al., 2001). A partir daí, o Brasil foi o primeiro país do mundo a ter uma

lei federal (Portaria n. 1469/2000 do Ministério da Saúde) sobre a obrigatoriedade de se fazer a detecção das cianobactérias e das cianotoxinas na água para abastecimento público (Jardim & Viana, 2003).

Tabela 10. Resultado do teste Elisa das ETA's – Análise da eficiência da remoção de microcistina

LOCALIZAÇÃO	DATA (mês/ano)	PONTOS	MICROCISTINA (µg/L)		
			CAPTAÇÃO	BRUTA	TRATADA
SF1	09/12	1	NR	0,1	0,2
SF1		2	NR	0,3	0,2
SF5		3	NR	NR	NR
SF1	05/13	1	< LD	<LD	<LD
SF1		2	<LD	<LD	<LD
SF5		3	<LD	<LD	0,12
SF1	06/13	1	<LD	<LD	<LD
SF1		2	<LD	<LD	<LD
SF5		3	<LD	<LD	<LD
SF1	07/13	1	<LD	<LD	<LD
SF1		2	<LD	<LD	<LD
SF5		3	<LD	<LD	<LD
SF1	08/13	1	<LD	<LD	<LD
SF1		2	<LD	<LD	<LD
SF5		3	<LD	<LD	<LD
SF1	09/13	1	<LD	<LD	<LD
SF1		2	<LD	<LD	<LD
SF5		3	<LD	<LD	<LD

Nota: SF1 – rio São Francisco – refere-se a ETA de Pirapora-MG; SF5 – rio das Velhas – refere-se a ETA de Várzea da Palma- MG; ponto 1 – ETA 1 Pirapora-MG; ponto 2 – ETA 2 Pirapora – MG; ponto 3 – ETA de Várzea da Palma – MG; <LD – abaixo do limite de detecção (0,1µg/L); NR – não realizado.

De onze amostras testadas com a técnica ELISA para saxitoxina, nove deram positivas (Tabela 11). Já para cilindrospermopsina de onze amostras testadas, todas obtiveram resultados abaixo do limite de detecção. Segundo Jardim, (2010) as florações de cianobactérias coletadas na represa da Pampulha foram frequentes nos últimos anos predominando as espécies *Sphaerocavum brasiliense* e *Cylindrospermopsis raciborskii* e que durante três anos foram feitas monitorizações e obtiveram resultados positivos para saxitoxina do tipo PSP (*Paralytic Shellfish Poisoning*). Segundo Sant'Anna et al., (2006) relata que as neurotoxinas são de ação mais rápida e por isso, de efeito predominante. Já Bittencourt-Oliveira et al., (2014) relata o registro de cilindrospermopsina no nordeste do Brasil, no Estado de Pernambuco em reservatórios destinados ao abastecimento público, e através da técnica ELISA foi possível analisar vinte e três amostras, das quais oito amostras demonstraram resultados positivos para cilindrospermopsina.

Tabela 11 Resultado do teste ELISA para saxitoxina

Teste ELISA		
Amostras	Tipo	Saxitoxina
2HBRP	Isolado	0.30µg/L
3HBME	Isolado	0.29 µg/L
4HBNA	Isolado	<LD
5HBCL	Isolado	0.31 µg/L
6HBCL	Isolado	0.33 µg/L
7HBCL	Isolado	0.2 µg/L
8HBRF	Isolado	0.27 µg/L
9HBRF	Isolado	0.11 µg/L
10HBRF	Isolado	0.03 µg/L
14HBRP	Ambiental	0.34 µg/L
18HBMT	Isolado	<LD

10.4 Extração, detecção e quantificação de microcistina por HPLC/PDA

O cromatograma obtido através da análise por HPLC/PDA apresentou para a amostra 9MMB o pico cromatográfico referente à microcistina-LR, com o tempo de retenção igual a 9.5 minutos (Figura 12). O espectro de absorção UV (238 nm) (Figura 13), um índice de similaridade de 0.999 (Figura 14) e uma concentração de 0.38µg/L.

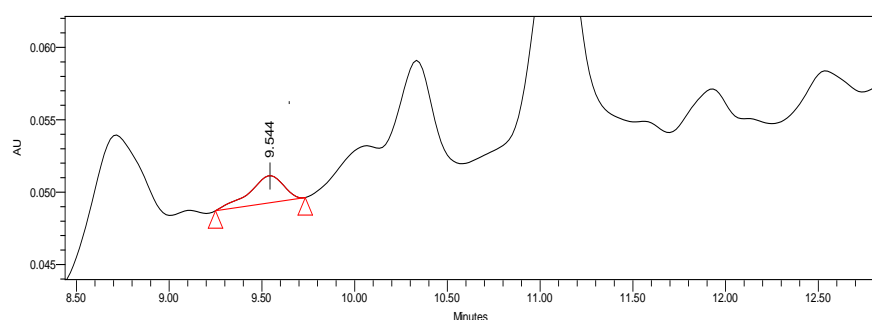


Fig. 12. Registro do pico referente a amostra de água bruta do rio das Velhas (Barra do Guaicui)

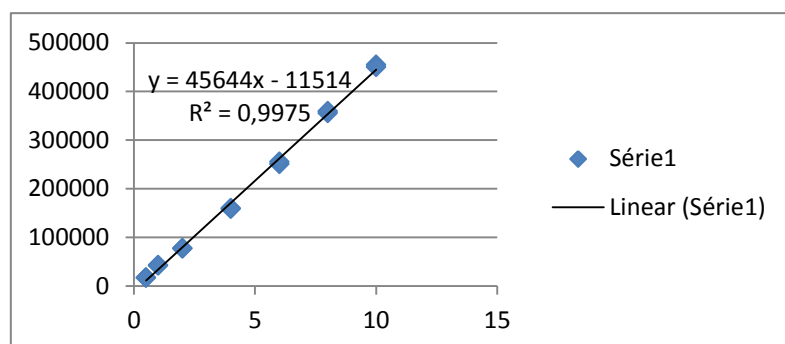


Fig. 13. Índice de similaridade referente a amostra do rio das Velhas

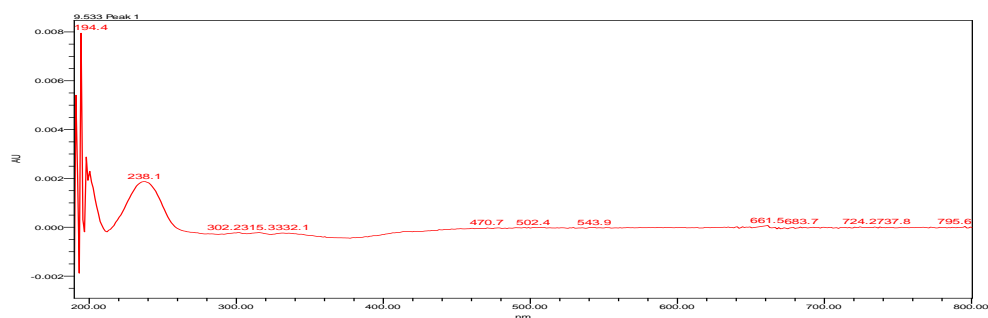


Fig. 14. Espectro padrão característico da molécula microcistina-LR – 238nm

10.5 Extração, detecção e quantificação de cilindrospermopsina por HPLC/PDA

No ensaio de cromatografia a amostra 9MMB do rio das Velhas no ponto à jusante, localizado na cidade da Barra do Guaicuí, município de Várzea da Palma – MG, foi possível identificar um pico de (7.30 min) (Figura 15), que corresponde ao espectro do padrão de cilindrospermopsina, com o tempo de retenção de 262 nm (Figura 16), um índice de similaridade de 0.999 (Figura 17) e uma concentração de 0.24µg/L. Resultado que corresponde à presença de cilindrospermopsina, o que parece indicar ser o primeiro resultado da toxina nesse ponto da região. Estudos já realizados foram identificados somente microcistina e saxitoxina em florações nesta região.

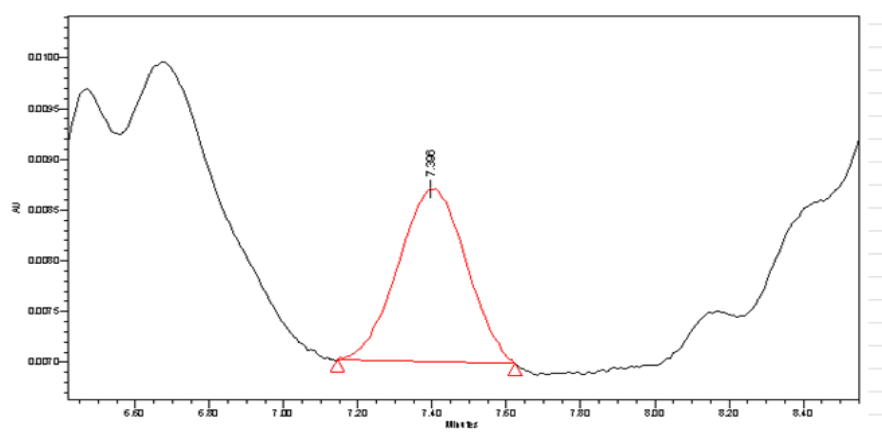


Fig. 15. Espectro característico da molécula de cilindrospermopsina.

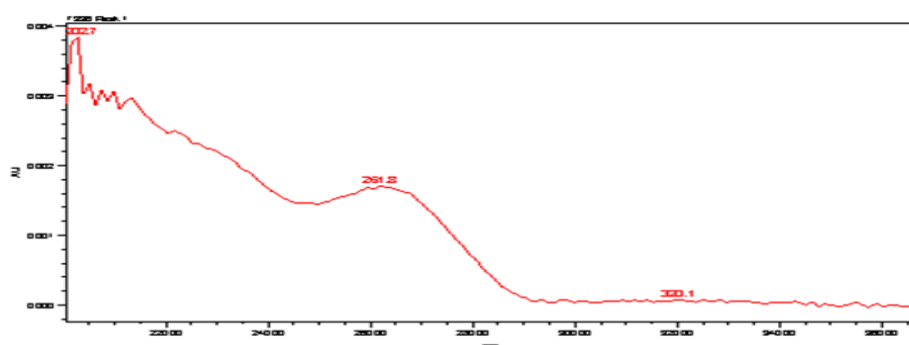


Fig. 16. Espectro de absorvância de 262 nm padrão da cilindrospermopsina

A análise foi realizada a partir de uma amostra ambiental, coletada em 09/2012. Foi realizada identificação por microscopia óptica das cianobactérias, porém o filamento encontrado foi o género *Planktothrix*, pode ser que

pelo fato de não haver formação de células especiais (heterocito e acineto), o filamento responsável por essa

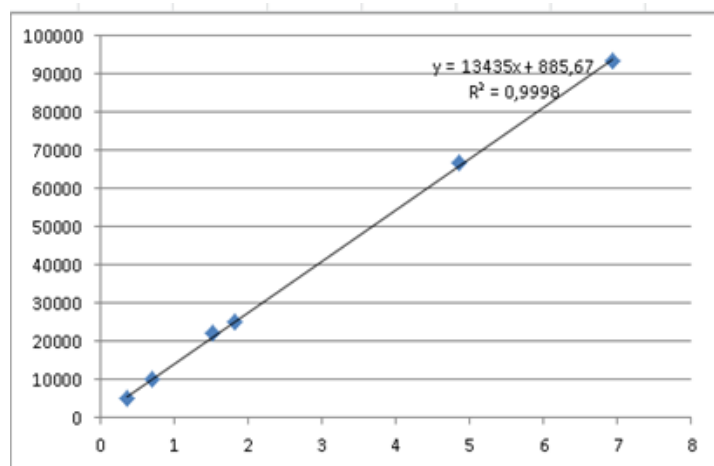


Fig. 17. Índice de similaridade referente a amostra do rio das Velhas

toxina tenha passado despercebido, ou também há hipótese das células terem sofrido ruptura e a toxina ter se libertado para o meio, uma vez que a amostra foi transportada do Brasil a Portugal, apesar do cuidado nas condições para assegurar o transporte das amostras, pode ter ocorrido a lise das células. Devido a escassez de material genético não foi possível realizar ensaio molecular para identificar o gene para espécie. A técnica HPLC/PDA é dispendiosa e trabalhosa, porém ao final do procedimento garante precisão nos resultados, pois é capaz de detetar a toxina e suas variantes, a partir dos padrões utilizados, e ainda se tratando de uma amostra purificada livre de contaminantes, ao contrário da técnica ELISA, que não permite detetar as variantes e quando se trabalha de uma amostra ambiental pode haver outros compostos que venham alterar o resultado, podendo até resultar um falso positivo. Contudo, a técnica ELISA é muito utilizada no Brasil pelas empresas de saneamento; corresponde as exigências da legislação é de fácil manipulação e o procedimento é rápido.

10.6 Análise molecular – extração de DNA, amplificação do PCR, sequenciamento e filogenia

De acordo com a (Figura 18) é possível identificar as amostras (01 HBRP, 14HBRP, 16HBRV e 17HBVP) que foram positivas para o gene DNA gyrase para a espécie *Microcystis aeruginosa*. A análise foi validada com o controlo positivo IZ 21 (*Microcystis aeruginosa*). As amostras trata-se da represa da Pampulha e do rio das Velha, essa espécie de cianobactéria é frequente e responsável pelas florações nesses corpos d'água. As amostras 14 e 17 referem-se a amostras ambientais e as amostras 01 e 16 referem-se a estirpes isoladas.

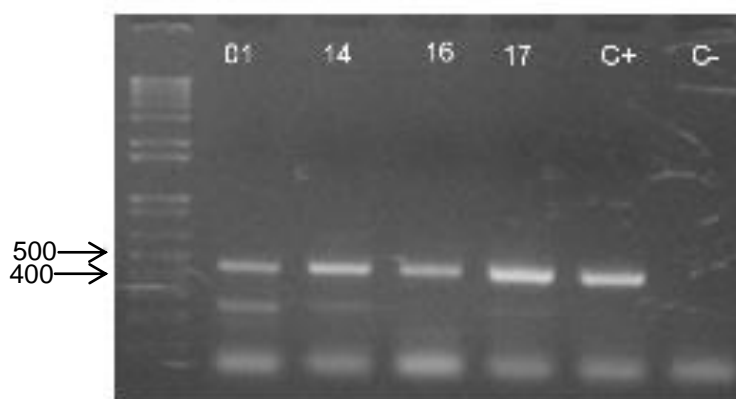


Fig. 18. Resultado PCR para *Microcystis aeruginosa*

A Tabela 12 representa o resultado do PCR referente aos genes das cianotoxinas testadas para o *cluster* de genes para microcistina. Todas as amostras analisadas demonstraram ser toxigênicas, pois expressaram parte dos fragmentos do gene *mcy*. As amostras positivas para o fragmento do gene *mcyA* indicam forte evidência de produzir microcistina (Hisbergues et al., 2003). Entretanto, quando o operon da microcistina não está presente ou parte do *cluster mcy* encontra-se incompleta, possivelmente a estirpe não é capaz de produzir a toxina (Regueiras, 2009). No entanto no teste ELISA a amostra 14HBRP demonstrou uma concentração de 0.9µg/L e a amostra 16HBRV uma concentração de 1.4µg/L a 5.9µg/L para microcistina. No entanto, o resultado da análise molecular para o *cluster mcy* demonstrou-se incompleto para alguns fragmentos do gene *mcy*. Bittencourt-Oliveira et al., (2003) afirma que os genótipos responsáveis por produzirem toxinas nem sempre são expressos, talvez seja uma hipótese para ambas as amostras (14HBRP e 16HBRP). Contudo, as amostras (1HBRP e 17HBVP) obtiveram resultados negativos para toxina na técnica ELISA e na análise molecular o *cluster* do gene *mcy* demonstrou-se incompleto, sendo assim, essas duas amostras se enquadra na afirmação citada acima; na incapacidade da estirpe em produzir toxina, a partir da ausência de algum fragmento do gene *mcy*. A amostra 18HBMT corresponde a espécie *Planktothrix agardhii* e no teste molecular foi realizada somente gene *mcyA*, resultando em uma espécie toxigênica, no entanto no método analítico (ELISA) para microcistina ficou abaixo do limite de detecção. Muitos estudos têm relatado essa situação, em que o *cluster* do gene *mcy* é encontrado, porém a presença da toxina não é confirmada por métodos analíticos; tal fato pode estar associado a uma concentração abaixo do limite de detecção do método utilizado (Bittencourt-Oliveira et al., 2010). Considerando que esta amostra (18HBMT) trata-se de uma estação de tratamento de água residual, e sendo efluente do ribeirão da Mata, afluente do rio das Velhas é preciso que seja constantemente monitorado para evitar os potenciais riscos adversos ao meio ambiente e consequentemente a saúde de animais e até mesmo do ser humano.

Tabela 12. Resultado PCR para conjunto génico mcy (toxina microcistina)

Amostras	mcyA	mcyB	mcyC	mcyD	mcyE	mcyG
01 HBRP	-	-	-	-	-	+
13HBRP	-					
14 HBRP	+	-	+	-	+	-
16 HBRV	+	-	+	+	-	-
17 HBVP	-	-	+	-	-	-
18 HBMT	+					

Ambas as amostras 3HBME e 14HBRP foram positivas para o gene da espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* e para o gene da toxina cilindrospermopsina (Tabela 13), no entanto no ensaio Elisa não foi detetada a toxina cilindrospermopsina. Portanto essas estirpes mostraram ter o potencial genético para a produção da toxina, todavia, devido às condições de exposição, as toxinas não foram produzidas e detetadas no momento da avaliação, o que não quer dizer, que não puderam vir a produzir quando estiverem expostas em condições ambientais favoráveis para a produção das toxinas (Bittencourt-Oliveira, 2003). O método molecular para o gene da saxitoxina (Tabela 13) foram todas negativas, entretanto para o ensaio ELISA de onze amostras, nove demonstraram positivas (Tabela 11). A hipótese para esse resultado pode ser atribuído a questão da seleção de estirpes tóxicas e não-tóxicas existente numa mesma espécie, pois o ensaio molecular foi realizado com cultura de uma segunda repicagem. Contudo a manutenção dessas estirpes em laboratório pode ter promovido a seleção de linhagens não-tóxicas. Ou outra hipótese para o resultado negativo para o gene da saxitoxina seria a pequena quantidade de DNA presente nas amostras tornando a análise inviável, pelo fato da análise molecular também ter um limite de detecção. Talvez o fragmento do *cluster* utilizado na análise não tenha correspondido ao DNA das amostras. Hoff-Rissetti et al., (2013) afirma a presença do gene *sxtI* e *cyr* numa estirpe isolada de *Cylindrospermopsis raciborskii* brasileira e sequências do gene *cyrA* foram traduzidos em aminoácidos e as funções das proteínas confirmaram a sua identidade como sendo genes da síntese de cilindrospermopsina, sendo relatado pelo autor que os resultados obtidos neste estudo foi o primeiro registo de cilindrospermopsina encontrado em estirpe isolada do Brasil.

Tabela 13. Resultado PCR's (sxtI, anaC, Cyn/cyrB e Cyn/cyrC) para as amostras do presente estudo

Amostras	sxtI	anaC	Cyn cyrB	Cyn cyrC
1 HBRP		+		
2 HBRP	-		-	
3 HBME	-		+	-
4 HBNA	-		-	-
5 HBCL	-		-	-
6 HBCL	-		-	-
7 HBCL	-	-	-	-
8 HBRF	-		-	-
9 HBRF	-	+	-	-
10 HBRF	-	+	-	-
11 HBRP				
12 HBRP		+		
13 HBRP	-	+		
14 HBRP	-	+	-	+
15 HBME				
16 HBRV		+		
17 HBVP	-	+	-	-
18 HBMT		+		
19 HBLA		+		

Na (figura 19) é possível verificar as amostras (4MMB e 9MMB) positivas para gene ps para cilindrospermopsina. Estas amostras foram da primeira coleta realizada a jusante do rio das Velhas na cidade da Barra do Guaicuí no município de Várzea da Palma-MG. A partir desse resultado do ensaio molecular, que se confirmou a presença da toxina com o ensaio da cromatografia. Uma vez, que o ensaio molecular indicou a presença do gene, mas não havia garantia da produção da toxina. A toxina estava solúvel no meio e não foi possível identificar que espécie a produziu. Para esse trecho do rio das Velhas é a primeira vez que há confirmação da toxina cilindrospermopsina, apenas há referências para saxitoxina, como já foram referidos anteriormente (Jardim et al., 2008). Segundo Bittencourt-Oliveira, (2011) foi detetado em florações de cianobactérias em 3 reservatórios, no nordeste do Brasil, as análises foram realizadas com ensaio molecular (cyrB e cyrC) e o teste ELISA; e a autora relata ser o primeiro estudo com resultado positivo para cilindrospermopsina em água de abastecimento público no Brasil. E refere ainda, que a presença do gene pks e ps para cilindrospermopsina é indicação que a estirpe tem o gene para cilindrospermopsina.

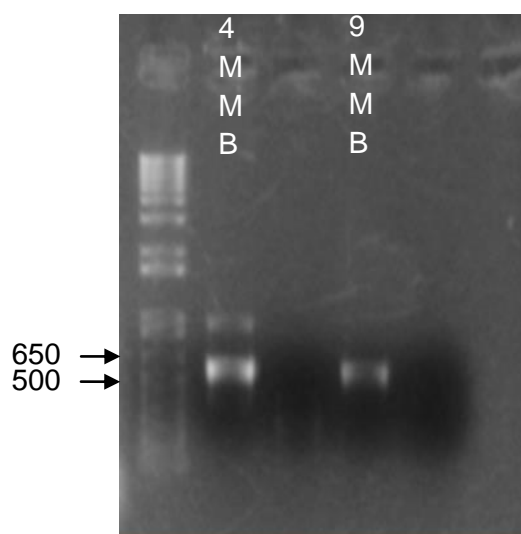


Fig. 19. Resultado do PCR para gene cyrB - Cilindrospermopsina

A (Figura 20) demonstra o resultado do PCR, que determina o potencial genético para a produção de anatoxina-a nas amostras (1HBRP, 9HBRF, 10HBRF, 12HBRP, 13HBRP, 14HBRP, 16HBRV, 17HBVP, 18HBMT e 19HBLA) que foram validadas com o controle positivo. Segundo a legislação brasileira, Portaria 2914/2011 do Ministério da Saúde, exige monitoramento somente para microcistina e saxitoxina. Para cilindrospermopsina e anatoxina-a(s) somente quando for detectada a presença de gêneros de cianobactérias potencialmente produtoras da toxina. Portanto não há exigência na legislação federal quanto anatoxina-a, mesmo existindo pesquisas demonstrando sua ação nociva a saúde humana e de animais (Molica & Azevedo, 2009 ; Rodríguez et al., 2006). As amostras (9HBRF, 14HBRP, 16HBRV, 17HBVP, 18HBMT e 19HBLA) foram sequenciadas, e submetidas a análise filogenética.

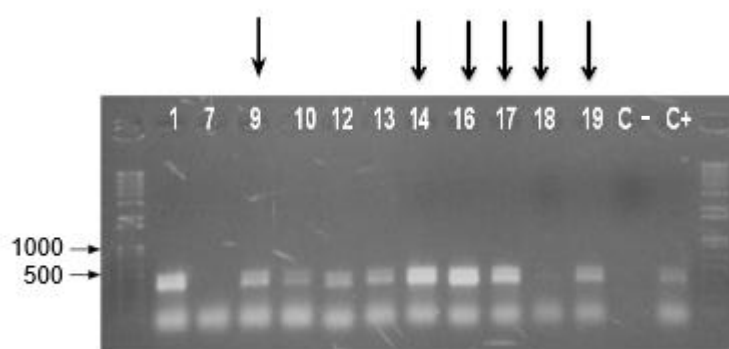


Fig. 20. Resultado do PCR para anatoxina-a.

A (Figura 21) representa o resultado da análise filogenética, demonstrando que não ocorreu similaridade genética entre as amostras do presente trabalho e as amostras do banco de dados fornecido pelo *BLAST*, demonstraram uma distância genética entre as estirpes analisadas. Provavelmente devido a diferença biogeográfica das amostras em estudo. As amostras do banco genômico correspondem a estirpes da Europa e as amostras do presente trabalho do Sul da América (Brasil). No entanto, entre as amostras (16HBRV, 18HBMT, 19HBLA) houve uma similaridade de 100% numa amostragem com base em 100 replicações. São amostragens de locais distintos, porém fazem parte da Sub-bacia do rio das Velhas. Stuken & Jakobsen, (2010) relata que a sequência de nucleótidos dos diferentes genes *mcy* tem sido demonstrado uma variação entre 67 e 81%; já a similaridade da saxitoxina

produzida por diversos géneros de cianobactérias de água doce comparadas entre os genes de sxt de *Aphanizomenon*, *Anabaena* e *Cylindrospermopsis* revelou uma identidade de nucleótidos de 53 um 99% dos diferentes genes ortólogos. Os mesmos autores ainda relatam que os genes envolvidos na síntese de cyn são altamente conservadas, não só entre estirpes da mesma espécie, mas também entre as estirpes de géneros diferentes.

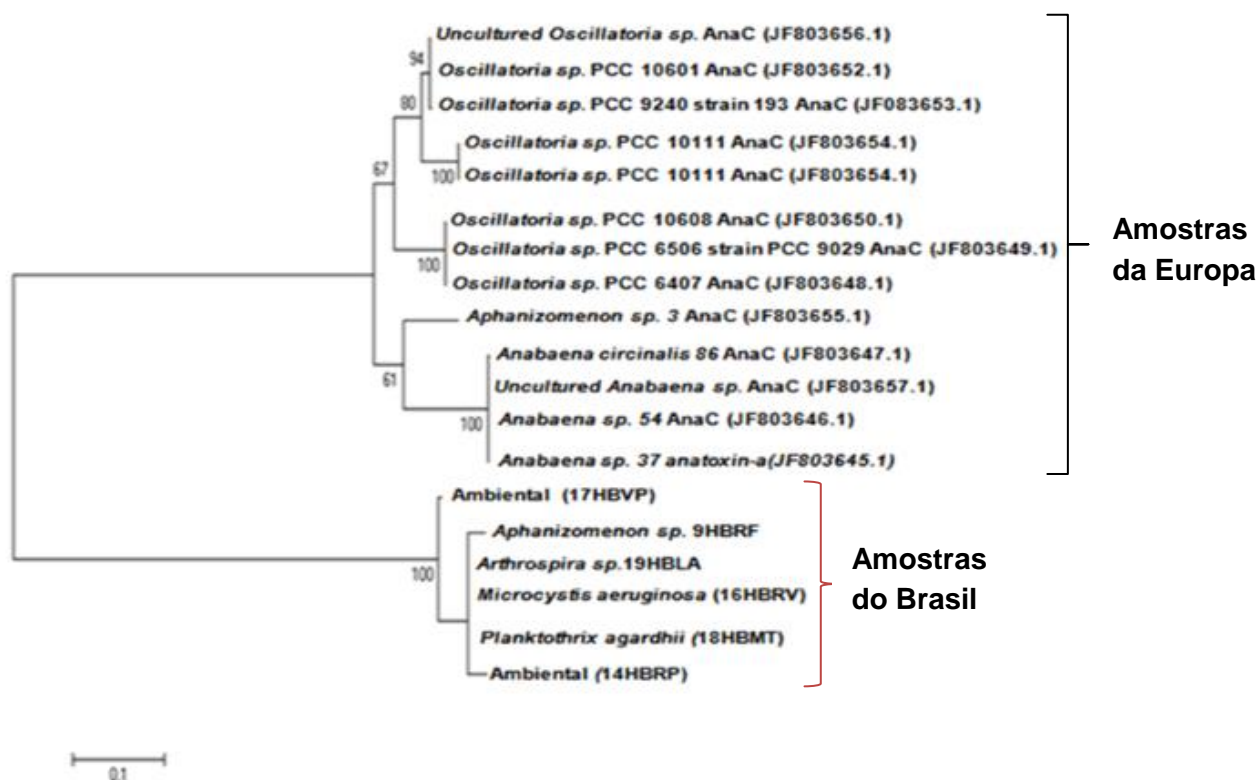


Fig. 21 Análise filogenética da sequência do gene anatoxina-a

11 Conclusão

Com base na pesquisa realizada pode-se concluir:

- ✓ O método molecular é uma ferramenta de grande importância na identificação de cianobactérias, na avaliação do potencial tóxico de genes específicos para as espécies e para detecção de genes envolvidos na produção de toxinas.
- ✓ É um recurso que permite detetar precocemente florações tóxicas, facilita a monitorização de ambientes aquáticos e minimiza riscos para saúde pública.
- ✓ As informações geradas no presente estudo fornecem um contributo para o conhecimento da diversidade das cianobactérias e cianotoxinas nos corpos hídricos tratados neste estudo.
- ✓ Os resultados obtidos proporcionarão uma nova visão relativa a futuras monitorizações para evitar riscos para saúde pública nas bacias hidrográficas em estudo.

12. Referências Bibliográficas

Adams, D. G., 2000. Symbiotic interactions, in the ecology of cyanobacteria. B.A. Whitton and J. Potts, Editors, Kluwer Academic Publishers, New York, USA, p. 523-561

An, J., Carmichael, W.W., 1994. Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins. *Toxicon* v. 32, p. 1495-1507.

Anciutti, M. & Cochôa, A., 2010. Identificação de cianobactérias tóxicas em um corpo hídrico no interior de Tangará, SC. *Unoes & Ciência – ACBS*, Joaçaba, v.1, n.1, p. 29-36, jan. / jun.

Aráoz, R., Molgo, J., Tandeau de Marsac, N., 2010. Neurotoxic cyanobacterial toxins. *Toxicon* 56, 813–828.

Azevedo, S. M. F. O., 1998. Toxinas de cianobactérias: Causas e consequências para a saúde pública. *Revista virtual de medicina*, v. 1, n. 3, ano 1 (jul/ago/set). <http://www.medonline.com.br>

Azevedo, S. M. F. O., Carmichael, W., Jochimsen, E., Rinehart, K., Lau, S., Shaw, G., Eaglesham, G., 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru – Brazil. *Toxicology* 181-182, p. 441-446.

Barreto, L. V., Barros, F., Bonomo, P., Rocha, F., Amorim, J., 2013. Eutrofização em rios Brasileiros. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer Goiânia*, v. 9, n. 16, p. 2165-2179.

Beltrame, A. B. & Pascholati, S. F., 2011. Cianobactérias e algas reduzem os sintomas causados por *Tobacco vosaic virus* (TMV) em plantas de fumo. *Summa Phytopathol., Botucatu*, v. 37, n. 2, p. 140-145.

Bicudo, C. & Menezes, M., 2006. Gêneros de algas de águas continentais do Brasil chave para identificação e descrições 2ªed. São Carlos, RiMa, p. 34-50.

Bittencourt-Oliveira, M., 2003. Detection of potential micocystin-producing cyanobacteria in Brazilian reservoirs with a mcyB molecular marker. *Harmful Algae* v. 2 p. 51-60. Available online at: <www.sciencedirect.com>. Acesso em 15/09/2014

Bittencourt-Oliveira, M., Santos, V., Barros, S., 2010. Toxic cyanobacteria in reservoirs in northeastern Brazil: detection using molecular method. *Brasilian Journal of Biology*, v. 70, n. 4, p. 1005-1010

Bittencourt-Oliveira, M., Santos, V., Kujbida, P., Moura, A., 2011. *Cylindrospermopsis* in water supply reservoirs in Brazil determined by immunochemical and molecular methods. *Journal of water resouce and protection*, v. 3, p. 349-355. Disponível :<<http://www.scirp.org/journal/jwarp>>. Acesso em 05 de outubro

Bittencourt-Oliveira, M., Santos, V., Moura, A., Tavares, N., Araújo, M., 2014. Cyanobacteria, microcystins and cylindrospermopsin in public drinking supply reservoirs of Brazil. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, v. 86, n. 1, p. 297-309. Disponível em: <www.scielo.br/aabc>. Acesso em 05/09/2014

Brasil, 2000. Resolução CONAMA nº 274, 29 de novembro de 2000. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF.

Brasil, 2005. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário oficial da União. 18 marc. 2005; Seção 1. p. 53. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 30 agosto

Brasil, 2011. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011, a qual dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário oficial da União. 14 dez. seção1, P.39. http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.

Brito, A., Ramos, V., Seabra, R., Santos, A., Santos, C., Lopo, M., Ferreira, S., Martins, A., Mota, R., Frazão, B., Martins, R., Vasconcelos, V., Tamagnini, P., 2012. Culture-dependent characterization of cyanobacterial of cyanobacterial diversity in the intertidal zones of the Portuguese coast: A polyphasic study. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 35, p. 110-119.

Camargos, L. M. M., 2005. *Plano-diretor de recursos hídricos da bacia hidrográfica do rio das Velhas*. Belo Horizonte: Instituto Mineiro de Gestão das Águas, Comitê da Bacia Hidrográficada Rio das Velhas, 228p.

Campinas, M., Teixeira, M., Lucas, H., Rosa, M., 2002. Previsão da capacidade de remoção de cianobactérias e cianotoxinas na Eta de Alcantarilha. Atas do 10º Encontro Nacional de Saneamento Básico. Associação Portuguesa de Saneamento Básico. Universidade do Minho, 16-19 de Setembro.

Canto de Sá, L., Vieira, J., Mendes, R., Pinheiro, S., Vale, E., Alves, F., Jesus, I., Santos, E., Costa, V., 2010. Ocorrência de uma floração de cianobactérias tóxicas na margem direita do Rio Tapajós, Município de Santarém (Pará, Brasil). Rev Pan-Amaz Saúde v.1, n.1, Ananindeua, março. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232010000100022>>. Acesso em 12/06/2014.

Carmichael, W. W., Azevedo, S., An, J., Molica, R., Jochimsen, E., Lau, S., Rinehart, K., Shaw, G., Eaglesham, G., 2001. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. Environmental Health Perspectives v. 109, n. 7, July

Carneiro, T. G. & Leite, F., 2008. Cianobactérias e suas toxinas. Revista Analytica n. 32. Disponível em: www.revistaanalytica.com.br/ed_anteriores/32/Art02.pdf Acesso em 12/06/2014

Carvalho, M., Agujaro, L., Pires, D., Picoli, C., 2013. Manual de cianobactérias Planctônicas: Legislação, orientações para monitoramento e aspectos ambientais. Cetesb- Companhia ambiental do Estado de São Paulo. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/>>. Acesso em 02/08/2014

Chorus & Bartram, 1999. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management, WHO, E&FN Spon, Routledge, London.

Churro, C., Pereira, P., Vasconcelos, V., Valério, E., 2012. Species-specific real-time PCR cell number quantification of the bloom-forming cyanobacterium *Planktothrix agardhii*. Springer, published online:07 April. (DOI: 10.1007/s00203-012-0809-y)

Cianca, R.C., Batista, M., Silva, L., Lopes, V., Vasconcelos, V., 2012. Reversed-phase HPLC/FC method for the quantitative analysis of the neurotoxin BMAA (β -N-methylamino-L-alanine) in cyanobacteria. Toxicon. v. 59, p. 379 - 384. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/toxicon>. Acesso em: 25/06/2014

Cybis, L., Bendati, M., Maizonave, C., Werner, V., Domingues, C., 2006. Manual para estudo de cianobactérias planctônicas em mananciais de abastecimento público: Caso da represa lombada de sabão e lago Guaíba, Porto Alegre – Rio Grande do Sul. ABES, 1º ed. p. 39-58, Rio de Janeiro. PROSAB

Deberdt, G., Calijuri, M., Minoti, R., 2004. A produtividade primária na represa Salto Grande. In: Henry, R. (ed). Ecologia de reservatórios: Estrutura, função e aspectos sociais. Botucatu: Fapesp/Fundbio

Esteves, F.A., 1998. *Fundamentos de Limnologia*. Rio de Janeiro: Interciência, p.622

Fastner, J., Flieger, I., Neumann, U., 1998. Optimised extraction do microcystins from field samples –A comparison of different solvents and procedures. *Wat.Res.* v. 32, n. 10, p. 3177 – 318. Elsevier Science

Fathalli, A., Jenhani, A., Moreira, C., Welker, M., Romdhane, M., Antunes, A., Vasconcelos, V., 2011. Molecular and phylogenetic characterization of potentially toxic cyanobacteria in Tunisian freshwaters. *Systematic and applied microbiology*, v. 34, p. 303 – 310. Disponível em :<www.elsevier.de/syapm>. Acesso em 15/08/2014

Ferrão-Filho, 2009. Bioacumulação de cianotoxinas e seus efeitos em organismos aquáticos. *Rev. Oecol. Bras.*, v. 13, n. 2, p. 272-312

Freire, S. M. & Bollman, H. A., 2003. Avaliação das cargas de macronutrientes em reservatórios de abastecimento público. In: *Simpósio Brasileiro de engenharia ambiental*, n. 2, Itajaí-SC. p.10-23

Hisbergues M., Christiansen, G, Rouhiainen, L., Sivonen, K., Borner, T., 2003. PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera. *Archives of Microbiology* 180(6), 402-410

Hoff-Risseti, C., Dorr, F., Schaker, P., Pinto, E., Werner, V., Fiore, M., 2013. *Cylindrospermopsis* and saxitoxin synthetase genes in *Cylindrospermopsis raciborskii* strains from Brazilian freshwater. *Plos one*, v. 8, p. 1-14, August.<Disponível em: www.plosone.org>. Acesso em 05/06/2014

IBGE (Instituto Brasileiro de geografia e estatística). Atlas de saneamento 2011. Disponível em:<www.ibge.gov.br/>. Acesso em: 15/09/2014

IBGE (Instituto Brasileiro de geografia e estatística). Censo de Minas Gerais 2010. Disponível em:<www.ibge.gov.br/>. Acesso em: 15/09/2014

IGAM (Instituto mineiro de gestão das águas). Disponível em: <<http://www.igam.mg.gov.br/images/stories/mapoteca/Mapas/upgrhs-de-minas.png>>. Acesso em: 19/05/2014

Jardim, F.& Viana, T., 2003. Análise de algas – Cianobactérias e cianotoxinas como parâmetros de controle do tratamento da água para abastecimento. 22º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. Joinville – Santa Catarina 14 a 19 de setembro.

Jardim, F., Moreira, A., Santos, D., Pimenta, A., Giani, A., 2007. Avaliação química das florações de cianobactérias – uma ferramenta útil para o monitoramento. 24º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. ABES – Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental.

Jardim et al., 2008. Cyanobacteria blooms in waters of river intake areas in Minas Gerais – Brazil during the dry season of 2007 – contingency plans.

Jardim, F., Carvalho, L. & Couto, P., 2010. Toxicidade e ecologia de *Cylindrospermopsis raciborskii* (cianobactéria) isolada da água de uma represa urbana. X Simpósio Ítalo-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. ABES – Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental.

Jardim, F., Pereira, S., Azevedo, S., Galinari, P., Ferreira, T., 2011. Remoção de fósforo solúvel reativo em águas eutróficas utilizando argila modificada com lantânio. 26º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. ABES – Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental.

Kellmann, R., Michali, T. K., Neilan, B. A., 2008. Identification of a saxitoxin biosynthesis gene with a history of frequent horizontal gene transfers. J Mol Evol, v. 67, p. 526 – 538. (DOI 10.1007/s00239-008-9169-2)

Li, R. & Carmichael, W., 2003. Morphological and 16SrRNA gene evidence for reclassification of the paralytic shellfish toxin producing *Aphanizomenon flos-aquae* Lemm. as *Aphanizomenon issatschenkoi* (Cyanophyceae). J. phycol., v. 39, p. 814-818.

Leão, P., Engene, N., Antunes, A., Gerwick, W., Vasconcelos, V., 2012. The chemical ecology of cyanobacteria. Review. Nat. Prod. Rep., v. 29, p. 372-391. www.rsc.org/npr

Lopes, V. R., Ramos, V., Martins, A., Souza, M., Welker, M., Antunes, A., Vasconcelos, V., 2012. Phylogenetic, chemical and morphological diversity of cyanobacteria from Portuguese temperate estuaries. Marine Environmental Research, v. 73, p. 7 – 16.

Macedo, C. F. & Sipaúba – Tavares, L., 2010. Eutrofização e qualidade da água na piscicultura: Consequências e recomendações. Bol. Inst. Pesca, São Paulo, v. 36, n. 2, p. 149 – 163.

Masten, S. & Carson, B., 2000. Cyindrospermopsin – Review of Toxicological literature. ILS – Integrated Laboratory Systems

Matthiensen, A., Yunes, J. S. & Codd, G. A., 1999. Ocorrência, distribuição e toxicidade de cianobactérias no Estuário da Lagoa dos Patos, RS. Ver. Brasil. Biol., v. 59, n. 3, p. 361-376.

Medina (Minas Gerais). In: Wikipédia, a enciclopédia livre. Flórida: Wikimedia Foundation, 2014. Disponível em: [http://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Medina_\(Minas_Gerais\)&oldid=40146175](http://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Medina_(Minas_Gerais)&oldid=40146175). Acesso em: 18/06/ 2014.

Melo Jardim, 2011. Variação dos parâmetros físicos e químicos das águas superficiais da bacia do Rio das Velhas – MG e sua associação com as florações de cianobactérias. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos da Universidade Federal de Minas Gerais. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/handle/1843/ENGD-8KDPVL>. Acesso em 16/09/2014

Molica, R & Azevedo, S., 2009. Ecofisiologia de cianobactérias produtoras de cianotoxinas. Revista Oecologia Brasiliensis, v.13, n.2, p. 229-246

Muller, C., Raya-Rodriguez, M., Cybis, L., 2009. Adsorção em carvão ativado em pó para remoção de microcistina de água de abastecimento público. Engenharia Sanit. Ambiente, v.14, n.1, p. 29-38, jan/mar.

Nanuque. In: Wikipédia, a enciclopédia livre. Flórida: Wikimedia Foundation, (2014). Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Nanuque&oldid=40313787>>. Acesso em: 18/06/2014.

Neilan B., Jacobs, D., Del, I., Blackall, L., Hawkins, P., Cox, P., Goodman, A., (1997). rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. International Journal of Systematic Bacteriology 47(3), 693-697.

Nonato, E. A., 2007. Tratamento estatístico dos parâmetros da qualidade das águas da bacia do alto curso do Rio das Velhas. *Quím. Nova*. v.30, n.4, p. 797-804.

Nübel U., Garcia-Pichel F., Muyzer G., 1997. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 63(8), 3327-3332.

Oliveira, A., Magalhães, V., Soares, R., Azevedo, S., (2005). Influence of Drinking Water Composition on Quantitation and Biological Activity of Dissolved Microcystin (Cyanotoxin). *Environmental Toxicology*, v. 20, n. 2, p. 126-130

Osswald, J., Rellán, S., Gago, A., Vasconcelos, V., (2007). Toxicology and detection methods of the alkaloid neurotoxin produced by cyanobacteria, anatoxin-a. *Environ. Int.* 33, 1070-1089. doi:10.1016/j.envint.2007.06.003

Pearson, L., Mihali, T., Moffitt, M., Kellmann, R., Neilan, B., (2010). On the Chemistry, Toxicology and Genetics of the Cyanobacterial Toxins, Microcystin, Nodularin, Saxitoxin and Cylindrospermopsin. *Mar. Drugs* 8, 1650-1680.

Pinho, L., Azevedo, J., Vasconcelos, V., Vilar, V., Boaventura, R., (2012). Decomposition of *Microcystis aeruginosa* and Microcystin-LR by TiO₂ oxidation using artificial UV light or natural sunlight. *J. Adv. Oxid. Technol.*, v. 15, n. 1, p. 98-106

Poniedzialek, B., Rzymiski, P., Wiktorowicz, K., 2014. Toxicity of cylindrospermopsin in human lymphocytes: Proliferation, viability and cell cycle studies. *Toxicology in Vitro*, v. 28, p. 968-974

Quahid Y., Pérez-Silva G., del Campo F.F., 2005. Identification of potentially toxic environmental *Microcystis* by individual and multiple PCR amplification of specific microcystin synthetase gene regions. *Environmental Toxicology* 20(3), 235-242.

Rantala-Ylinen A., Kana, S., Wang, H., Rouhiainen, L., Wahlsten, M., Rizzi, E., Berg, K., Gugger, M., Sivonen, K., 2011. Anatoxin-a synthetase gene cluster of the cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain 37 and molecular methods to detect potential producers. *Applied and Environmental Microbiology* 77(20), 7271-7278.

Regueiras A., 2009. Comparação de métodos de identificação e quantificação de cianobactérias e suas toxinas na Albufeira do Torrão (Rio Tâmega), Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Contaminação e Toxicologia Ambientais, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto, 1-127.

Resck, R.P.; Bezerra-Neto, J.F. & Pinto-Coelho, R.M., 2007. Nova batimetria e uma avaliação ecológica de parâmetros morfométricos da Lagoa da Pampulha – Belo Horizonte – Brasil. Lab. Gestão Ambiental de Reservatórios, Depto. Biologia Geral ICB-UFMG, BH-MG. <http://ecologia.icb.ufmg.br/ecmus/>

Rio São Francisco. In: Wikipédia, a enciclopédia livre. Flórida: Wikimedia Foundation, 2014. Disponível em:
<http://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Rio_S%C3%A3o_Francisco&oldid=40636941>. Acesso em: 18/06/2014.

Rodríguez, V., Moura, S., Pinto, E., 2006. Aspectos toxicológicos e químicos da anatoxina-a e seus análogos. Quim. Nova, v. 29, N. 6, P. 1365-1371

Sant' Anna, C., Azevedo, M., Agujaro, L., Carvalho, M., Carvalho, L., Souza, R., 2006. Manual ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras. Ed. Interciência, RJ. Sociedade Brasileira de Ficologia.

Sant'Anna, C., Melcher, S., Carvalho, M., Gelmego, M., Azevedo, M., 2007. Planktic cyanobacteria from upper Tietê basin reservoirs, SP, Brazil. Rev. Bras. Bot., São Paulo, v. 30, n. 1, p. 1-17 Marc. Disponível em<http://www.scielo.br/scielo.php?script=SCI_arttext&pid=S010084042007000100002&lng=en&nrm=ISO.acesson15set.2014.<http://dx.doi.org/10.1590/S010084042007000100002>>. Acesso em 10/09/2014

Sant'Anna, C., Tucci, A., Azevedo, M., Melcher, S., Werner, V., Malone, C., Rossini, E., Jacinavicius, F., Hentschke, G., Osti, J., Santos, K., Junior, W., Rosal, C., Adame, G., 2012. Atlas de cianobactérias e micro algas de águas continentais brasileiras. Publicação eletrônica, Instituto de Botânica, Núcleo de Pesquisa em Ficologia. Disponível em :<www.ibot.sp.gov.br>. Acesso em 05/09/2014.

Schembri M.A., Neilan B.A., Saint C.P., 2001. Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. Environmental Toxicology 16(5), 413-421.

Silva, E. M., Gomes, C., Ramos, C., Bricio, S., 2013. Occurrence of Cyanobacteria in Mundaú reservoir, in Pernambuco State during January 2010 to November 2011.Rev. Visa em debate, v.1 n.3, p. 35-42Disponível no site: <<http://www.visaemdebate.incqs.fiocruz.br/>>. Acesso em 13/09/2014

Sivonen, K. & Jones, G., 1999. Cyanobacterial toxins. In: Chorus I, Bartram J, eds, Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management , London, Spon Press, p. 41–111.

Stoichev, T.,Baptista, M., Basto, M., Vasconcelos, V., Vasconcelos, M., 2011.Effects of minocycline and its degradation products on the growth of Microcystis aeruginosa. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 74, p. 219-224.

Stuken, A. & Jakobsen, K., 2010. The cylindrospermopsin gene cluster of *Aphanizomenon* sp. Strain 10E6: organization and recombination. Microbiology, v. 156, p. 2438-2451

Tanabe, Y., Kasai, F., Watanabe, M., 2007. Multilocus sequence typing (MLST) reveals high genetic diversity and clonal population structure of the toxic cyanobacterium Microcystis aeruginosa. Microbiology, v. 153, p. 3695-3703.

Tucci, A. & Sant'Anna, C., 2003. Cylindrospermopsis raciborskii (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju (Cyanobacteria): variação seminal e relações com fatores ambientais em um reservatório eutrófico, São Paulo, SP, Brasil. Revista Brasil Bot., v. 26, n. 1, p. 97-112. Mar.

Tundisi, J., 2008. Recursos hídricos no future: problemas e soluções. Estudos avançados, v. 22, n. 68, p. 7-16.

Tupinambá, B. & Jardim, F., 2012. Avaliação da toxicidade de cianobactérias provenientes do efluente da estação de tratamento de esgoto de Matozinhos, MG. XV SILUBESA – Simpósio Luso-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 18 a 22 de março. ABES – Associação Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental.

Usinahidrelétrica de furnas. In: Wikipédia, a enciclopédia livre. Flórida: Wikimedia Foundation, 2014. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Usina_Hidrel%C3%A9trica_de_Furnas&oldid=40335328>. Acesso em: 18/06/ 2014.

Vasconcelos, 2006. Eutrophication, toxic cyanobacteria and cyanotoxins: When ecosystems cry for help. Limnetica, v. 25, n. (1,2), pg. 425-432.

Vasconcelos, V., Morais, J., Vale, M., 2011. Microcystins and cyanobacteria trends in a 14 year monitoring of a temperate eutrophic reservoir (Aguieira, Portugal).Journal. Environmental. Monitoring. v. 13, p. 668-672.

Veiga. N., 2008. Cianobactéria tóxica na água para consumo humano. Artigo científico apresentado ao concurso do curso de Gestão ambiental das Faculdades Integradas Vianna Junior do primeiro semestre de 2008.

Waterbury, J. B., 2006. The cyanobacteria – Isolation, purification anda identification. v. 4, p. 1053 – 1073. (DOI: 10.1007/0-387-30744-3_38).

Wilson, K., Schembri, M., Baker, P., Saint, C., 2000.Molecular characterization of the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* and design of a species – specific PCR.Applied and environmental microbiology, v. 66, n.1, p. 332-338, Jan.